

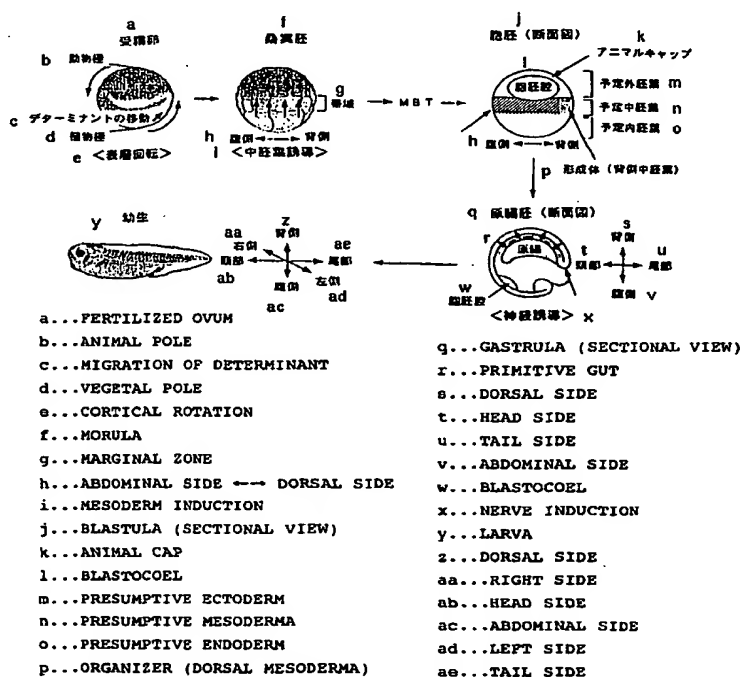
<p>(51) 国際特許分類 C12N 5/06</p>	<p>A1</p>	<p>(11) 国際公開番号 WO00/44881</p> <p>(43) 国際公開日 2000年8月3日(03.08.00)</p>
<p>(21) 国際出願番号 PCT/JP00/00148</p> <p>(22) 国際出願日 2000年1月14日(14.01.00)</p> <p>(30) 優先権データ 特願平11/21077 1999年1月29日(29.01.99) JP</p> <p>(71) 出願人 (米国を除くすべての指定国について) 科学技術振興事業団 (JAPAN SCIENCE AND TECHNOLOGY CORPORATION) [JP/JP] 〒332-0012 埼玉県川口市本町四丁目1番8号 Saitama, (JP)</p> <p>(72) 発明者; および (75) 発明者/出願人 (米国についてのみ) 浅島 誠(ASASHIMA, Makoto)[JP/JP] 〒170-0005 東京都豊島区南大塚三丁目40番9号 Tokyo, (JP) 有泉高史(ARIIZUMI, Takashi)[JP/JP] 〒214-0036 神奈川県川崎市多摩区南生田二丁目29番8号 パナホームサンライズ201 Kanagawa, (JP) 詹 徳川(CHAN, Te-chuan)[-/JP] 〒153-0041 東京都目黒区駒場一丁目28番7号 203 Tokyo, (JP)</p>	<p>(74) 代理人 廣田雅紀(HIROTA, Masanori) 〒107-0052 東京都港区赤坂二丁目8番11号 第11赤坂葵ビル502 Tokyo, (JP)</p> <p>(81) 指定国 RU, US, ZA, 欧州特許 (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE)</p> <p>添付公開書類 国際調査報告書</p>	

(54) Title: ORGANS FOR TRANSPLANTATION INDUCED *IN VITRO*

(54) 発明の名称 インビトロで誘導した移植用臓器

(57) Abstract

Organs for transplantation aiming at establishing a method for the induction *in vitro* and vital transplantation of organs with the use of embryological or organological techniques so as to evaluate whether or not organs induced *in vitro* actually function *in vivo*, and opening the way for the transplantation therapy for higher animals suffering from congenital renal diseases, etc. In the presence of a member of the TGF- β family such as activin, an organ (kidney, heart, pancreas, intestinal tract, etc.) having been induced *in vitro* is cultured until a definite developmental stage appropriate for the developmental stage of a recipient animal of the same species to thereby provide an organ which can function *in vivo* after transplantation. The developmental stage can be examined by using as a molecular marker a genomic DNA which is expressed depending on the developmental stage of the organ having been induced *in vitro*.



インビトロで誘導した臓器が実際に生体内でも機能するかどうかを評価するために、発生工学あるいは臓器工学を利用し、臓器のインビトロでの誘導と生体移植の手法を確立し、より高等な動物の先天性腎疾患等の移植治療への道を拓く移植用臓器を提供するためのものである。アクチビン等のTGF- β ファミリーの存在下、インビトロで誘導した腎臓、心臓、膵臓、肝臓、腸管等の臓器を、同種の被臓器移植動物の発生ステージに応じた所定の発生ステージまで該臓器を培養し、生体内に移植した際に生体内で機能することができる移植用臓器を調製する。発生ステージは、インビトロで誘導した臓器の発生ステージに応じて発現するゲノムDNAを分子マーカーとして検定することができる。

PCTに基づいて公開される国際出願のパンフレット第一頁に掲載されたPCT加盟国を同定するために使用されるコード(参考情報)

AE アラブ首長国連邦	DM ドミニカ	KZ カザフスタン	RU ロシア
AG アンティグア・バーブーダ	DZ アルジェリア	LC セントルシア	SD スーダン
AL アルバニア	EE エストニア	LI リヒテンシュタイン	SE スウェーデン
AM アルメニア	ES スペイン	LK スリ・ランカ	SG シンガポール
AT オーストリア	FI フィンランド	LR リベリア	SI スロヴェニア
AU オーストラリア	FR フランス	LS レソト	SK スロヴァキア
AZ アゼルバイジャン	GA ガボン	LT リトアニア	SL シェラ・レオネ
BA ボスニア・ヘルツェゴビナ	GB 英国	LU ルクセンブルグ	SN セネガル
BB バルバドス	GD グレナダ	LV ラトヴィア	SZ スワジランド
BE ベルギー	GE グルジア	MA モロッコ	TD チャード
BF ブルキナ・ファソ	GH ガーナ	MC モナコ	TG トーゴ
BG ブルガリア	GM ガンビア	MD モルドヴァ	TJ タジキスタン
BJ ベナン	GN ギニア	MG マダガスカル	TM トルクメニスタン
BR ブラジル	GR ギリシャ	MK マケドニア旧ユーゴスラヴィア	TR トルコ
BY ベラルーシ	GW ギニア・ビサウ	共和国	TT トリニダード・トバゴ
CA カナダ	HR クロアチア	ML マリ	TZ タンザニア
CF 中央アフリカ	HU ハンガリー	MN モンゴル	UA ウクライナ
CG コンゴ	ID インドネシア	MR モーリタニア	UG ウガンダ
CH スイス	IE アイルランド	MW マラウイ	US 米国
CI コートジボアール	IL イスラエル	MX メキシコ	UZ ウズベキスタン
CM カメルーン	IN インド	MZ モザンビーク	VN ヴェトナム
CN 中国	IS アイスランド	NE ニジェール	YU ユーゴスラヴィア
CR コスタ・リカ	IT イタリア	NL オランダ	ZA 南アフリカ共和国
CU キューバ	JP 日本	NO ノルウェー	ZW ジンバブエ
CY キプロス	KE ケニア	NZ ニュージーランド	
CZ チェッコ	KG キルギスタン	PL ポーランド	
DE ドイツ	KP 北朝鮮	PT ポルトガル	
DK デンマーク	KR 韓国	RO ルーマニア	

明 細 書

インビトロで誘導した移植用臓器

技術分野

本発明は、発生工学又は臓器工学に関し、より詳しくは、生体内に移植した際に生体内で機能することができる、インビトロで誘導した移植用の腎臓、心臓、脾臓、肝臓、腸管、脊索、骨格筋、白血球、赤血球、リンパ球等の臓器及びその調製方法や評価方法に関する。

背景技術

すべての多細胞動物の発生は受精にはじまり、細胞分裂（卵割）と細胞分化を経て、多くの組織とバランスのとれた体制をもつ個体として完成されるが、このような分化のプロセスはきわめて複雑であり、誘導現象と呼ばれる重要な細胞間の相互作用が多段階にわたって行われていると考えられ、そして、もっとも重要なのは「形作りを支配する分子」の解明といわれており、またこのような研究の材料として、主に両生類胚がよく用いられるが、体づくりの基本的な法則はすべての脊椎動物に共通であり、相同な遺伝子は異なった生物種においてもきわめて類似した機能をもつことが知られている。

従来より、両生類の胚は実験発生学においてきわめて重要な材料とされ、多くの研究がなされてきている。その理由は、体外で受精と発生をおこない、卵が大きいために胚手術が可能で、経時的変化を容易に観察できることにある。両生類の原腸胚の原口上唇部は特殊な領域であり、他の胚の腹側にこれを移植すると頭部もしくは胴尾部を含む二次胚が誘導され、このことから、原口上唇部は胚の体制を決定し形態形成の中心

として働く領域として形成体(organizer)と名付けられており、形成体は原腸陥入のあいだに予定外胚葉へと働きかけて中枢神経を誘導し、それ自身は背側の中胚葉に分化することはよく知られている。

また、実験動物として用いられるアフリカツメガエルの未受精卵は、動物極と植物極を結ぶ上下の軸をあらかじめ有するものの、背腹軸と左右軸は決定されておらず、受精すると、卵の表層と内側の細胞質の間に回転がおり、その結果精子の侵入した側が将来の腹側、反対側が背側になることや、精子は必ず動物半球に侵入し、侵入点の180度反対側が将来の原口となることや、表層の回転は、受精卵の細胞質に含まれる体軸決定因子(デターミナント)の分布に偏りを生じさせ、このために背腹軸が成立することが知られている。図1に、アフリカツメガエルの発生過程を模式的に示す。

図1からもわかるように、中胚葉誘導は、卵割が進行して胚が桑実胚期に達するころに開始される最初の誘導であり、これは植物半球の割球が動物半球の割球に働きかけて帯域に中胚葉を誘導する現象として実験的にその存在が証明されている。このとき植物半球割球は背腹軸に沿った誘導の勾配をもち、腹側の割球は腹側中胚葉を、背側の割球は形成体を含む背側中胚葉を誘導する、すなわち、中胚葉誘導は中胚葉の部域化を行い、形成体の領域を特定することが知られている。そして、この中胚葉誘導は両生類に特有な現象ではなく、すべての脊椎動物の初期胚で中胚葉と形成体の形成にかかわっていると考えられている。

また、誘導現象においては何らかの化学物質が細胞間で輸送されていると考えられているが、中胚葉誘導では植物半球の細胞から動物半球側に分泌されるものが中胚葉誘導因子と呼ばれ、この胚に存在する中胚葉誘導因子の固定は、発生学研究のもっとも重要なテーマの一つであり、両生類の胚では、古くからさまざまな胚手術が行われており、誘導因子

のアッセイ系も確立されている。例えば、中胚葉誘導因子の活性を直接的に調べる方法としてアニマルキャップアッセイが、主に候補となる因子やレセプター分子などのmRNAを2細胞期から8細胞期の受精卵に注入して正常発生への影響を調べる方法としてインジェクションアッセイが、それぞれ知られている。そして本発明者らは、かかるアニマルキャップアッセイを用いて、TGF- β ファミリーの細胞成長因子アクチビンに中胚葉誘導活性があることを最初に報告した(Roux' Arch. Dev. Biol. 198: 330-335, 1990)。

一方、脊椎動物の発生過程では、前腎、中腎、後腎という3つの腎臓が順に作られ、それらが排出器官として機能し、これらの腎臓は中間中胚葉に由来し、時間的にも空間的にも整然と形づくられ、特に前腎は最初に作られる非常に単純な構造をもった排出器官であり、腎臓の基本単位であるネフロン数は3種類で異なるが、その細胞学的な性質は共通であり、したがって、前腎は腎臓形成の仕組みを研究する上でとても有用なモデル系として知られている。本発明者らは、前腎(前腎細管)を誘導する比較的簡単な実験系を確立し、ツメガエルの胞胚期の外胚葉片をアクチビンとレチノイン酸で処理すると前腎細管が誘導され、この前腎細管はオタマジャクシの前腎に発現するいくつかの分子マーカーを発現することを確認している。しかし、この前腎(前腎細管)が生体に移植した際に臓器として機能することができるかどうかについては知られていなかった。

これまでに両生類胚の腎臓、すなわち前腎をインビトロで誘導する実験系の確立が世界中で試みられ、前腎だけを特異的に誘導することは不可能とされていたが、上記のように、本発明者らはツメガエルの胞胚の外胚葉片を生理活性物質であるアクチビンとレチノイン酸で処理し、前腎のみを分化させる実験系を確立した。しかし、このインビトロで誘導

した前腎は、生体に移植され実際に排出器官として機能することが確認されて初めて移植用臓器として認められることになる。

発明の開示

本発明の課題は、インビトロで誘導した臓器が実際に生体内でも機能するかどうかを評価するために、発生工学あるいは臓器工学を利用し、臓器のインビトロでの誘導と生体移植の手法を確立し、より高等な動物の先天的腎疾患等の移植治療への道を拓く移植用臓器を提供することにある。

本発明者らは、アフリカツメガエルの胚の外胚葉片（多分化能を備えた細胞集団）をアクチビンとレチノイン酸で処理し、個体発生で最初に作られる最も基本的な排出器官である前腎の分化誘導を行い、続いて前腎へ分化の方向性が決まった外胚葉片を、あらかじめ前腎原基（本来、前腎を形成する領域）を除去した胚に、該前腎原基の発生ステージに応じた所定の発生ステージまで培養した後移植すると、インビトロで作った前腎が生体内で機能することを世界で初めて見出し、インビトロで作った臓器を生体に移植することができることを確認し、本発明を完成するに至った。

すなわち本発明は、インビトロで誘導した臓器を同種の被臓器移植動物の生体内に移植した際に生体内で機能することができる臓器の調製方法であって、被臓器移植動物の発生ステージに応じた所定の発生ステージまで該臓器を培養することを特徴とする移植用インビトロ誘導臓器の調製方法や、被臓器移植動物の発生ステージに応じた所定の発生ステージが、被臓器移植動物と同じ発生ステージであることを特徴とする請求項1記載の移植用インビトロ誘導臓器の調製方法や、所定の発生ステージを、インビトロで誘導した臓器の発生ステージに応じて発現するゲノ

ムDNAを分子マーカーとして検定することを特徴とする請求項1又は2記載の移植用インビトロ誘導臓器の調製方法や、インビトロで誘導した臓器が、胞胚から切除した外胚葉域から誘導した臓器であることを特徴とする請求項1～3のいずれか記載の移植用インビトロ誘導臓器の調製方法や、インビトロでの誘導が、TGF（形質転換成長因子）- β ファミリーの存在下で行われることを特徴とする請求項1～4のいずれか記載の移植用インビトロ誘導臓器の調製方法や、TGF（形質転換成長因子）- β ファミリーが、アクチビンであることを特徴とする請求項5記載の移植用インビトロ誘導臓器の調製方法や、インビトロでの誘導が、アクチビン及びレチノイン酸の存在下で行われることを特徴とする請求項1～4のいずれか記載の移植用インビトロ誘導臓器の調製方法や、臓器が、腎臓、心臓、脾臓、肝臓、腸管、脊索、骨格筋、白血球、赤血球、リンパ球から選ばれることを特徴とする請求項1～7のいずれか記載の移植用インビトロ誘導臓器の調製方法や、被臓器移植動物の生体が、胚であることを特徴とする請求項1～8のいずれか記載の移植用インビトロ誘導臓器の調製方法や、被臓器移植動物が、脊椎動物であることを特徴とする請求項1～9のいずれか記載の移植用インビトロ誘導臓器の調製方法に関する。

また本発明は、上記請求項1～10のいずれか記載の移植用インビトロ誘導臓器の調製方法により調製することを特徴とするインビトロで誘導された移植用臓器や、インビトロで誘導した非ヒト動物の臓器を、同種の被臓器移植非ヒト動物の生体内に移植することを特徴とするインビトロで誘導した非ヒト動物の臓器の評価方法や、インビトロで誘導した非ヒト動物の臓器を、同種の被臓器移植非ヒト動物の発生ステージに応じた所定の発生ステージまで培養し、該培養後の臓器を被臓器移植動物の生体内に移植することを特徴とするインビトロで誘導した非ヒト動

物の臓器の評価方法や、所定の発生ステージを、インビトロで誘導した臓器の発生ステージに応じて発現するゲノムDNAを分子マーカーとして検定することを特徴とする請求項13記載のインビトロで誘導した非ヒト動物の臓器の評価方法や、インビトロで誘導した臓器が、胞胚から切除した外胚葉域から誘導した臓器であることを特徴とする請求項13又は14のいずれか記載のインビトロで誘導した非ヒト動物の臓器の評価方法や、インビトロでの誘導が、TGF（形質転換成長因子）- β ファミリーの存在下で行われることを特徴とする請求項13～15のいずれか記載のインビトロで誘導した非ヒト動物の臓器の評価方法や、臓器が、腎臓、心臓、脾臓、肝臓、腸管、脊索、骨格筋、白血球、赤血球、リンパ球から選ばれることを特徴とする請求項13～16のいずれか記載のインビトロで誘導した非ヒト動物の臓器の評価方法に関する。

図面の簡単な説明

第1図は、アフリカツメガエルの発生過程を模式的に説明する図である。

第2図は、中胚葉誘導因子であるアクチビン及び他の生理活性物質によって誘導を受けたアニマルキャップの器官形成を説明する図である。

第3図は、アクチビンとレチノイン酸の混合溶液で処理されたアニマルキャップに誘導された前腎細管の写真である。

第4図は、前腎細管に分化する外胚葉片を、あらかじめ左右の前腎原基を摘出除去したアフリカツメガエルの胚の除去部位片側に移植する概要を示す図である。

第5図は、前腎原基が摘出除去され水腫を形成したアフリカツメガエルのオタマジャクシ（上）と、前腎細管に分化した移植片を片側にもつ正常に発生したアフリカツメガエルのオタマジャクシ（下）の写真であ

る。

第6図は、アフリカツメガエル発生ステージ第20期における前腎細管へ誘導された移植片をもつ移植体と移植を受けなかった前腎原基摘出除去体との術後の生存カーブを示す図である。

発明を実施するための最良の形態

本発明の移植用インビトロ誘導臓器の調製方法は、インビトロで誘導した臓器を同種の被臓器移植動物の生体内に移植した際に生体内で機能することができる臓器の調製方法であって、被臓器移植動物の発生ステージに応じた所定の発生ステージまで該臓器を培養することを特徴とする。

本発明におけるインビトロで誘導される臓器には、腎臓、心臓、脾臓、肝臓、腸管等動物の内臓等を構成する器官の他に、便宜上、脊索、骨格筋、白血球、赤血球、リンパ球などの組織が含まれる。また、本発明における被臓器移植動物としては、インビトロで誘導される臓器と同種、すなわち分類学上同じ“種(species)”の脊椎動物、例えばイモリやカエル等の両生類、魚類、鳥類、マウス等の哺乳動物などの非ヒト動物の他に、ヒトも含まれる。

臓器のインビトロでの誘導は、胞胚から切除した外胚葉域（アニマルキャップ）を用いることが望ましい。胞胚の予定外胚葉領域は未分化の細胞群であるため、培養液に含まれる物質に中胚葉誘導活性がない場合は組織を分化することなく、表皮様細胞の塊（不整形表皮）となるが、培養液中に中胚葉誘導活性が存在すると内部に血球、筋肉、脊索などの中胚葉を含む組織塊となる。細胞分化及び発生ステージの検定には、組織の観察と同時に多くの遺伝子マーカーや抗体を用いた定量的解析を行うことが好ましい。

インビトロで誘導した臓器を同種の被臓器移植動物の生体内に移植した際に生体内で機能することができるかどうかは移植時期に大きく依存することから、インビトロで誘導した移植用臓器は、同種の被臓器移植動物の発生ステージに応じた所定の発生ステージ、すなわち生体内に移植した際に生体内で機能することができる発生ステージまで培養する必要がある。そして、多くの場合、被臓器移植動物と同じ発生ステージまで培養し、該培養後の臓器を被臓器移植動物の生体内に移植すると、生体内に移植した際に生体内で機能する可能性が大きくなる。例えば、被臓器移植動物の移植対象となる臓器が原基（primordium）である発生ステージのときは、移植用臓器も同じ発生ステージの原基まで生理食塩水等を用いて培養することが、また移植対象となる臓器が完全な器官である発生ステージのときは、移植用臓器も同じ発生ステージの完全な器官まで血清等を用いて培養することが好ましい。ここで、発生ステージとは、受精卵又は単為発生卵などを出発点として一つの生物が成体に到達する個体発生の進行を、一定の段階（ステージ）に区切って番号をつけた各段階（ステージ）をいい、例えば両生類では変態に至るまでが約60期の発生ステージに分けられている。

かかるインビトロ誘導臓器の発生ステージの検定は、上記のように組織の観察や抗体を用いる方法によっても行うことができるが、インビトロで誘導した臓器の発生ステージに応じて発現するゲノムDNAを分子マーカーとすることにより一層精確な検定を実施することができる。例えば、両生類胚の正常発生においては、卵割が12回行われた中期胞胚期からゲノムDNAの発現が急激に増加し、その後は胚の発生ステージに応じて発現する遺伝子の量と種類が厳密な階層を示しながら変化していくことが明らかになっているが、アクチビンにより処理されたインビトロ誘導臓器においても、表1に示すようにこの階層は完全に再現され

ている。また特に、アフリカツメガエルの腎臓分化に関連するマーカー遺伝子としては、発生ステージ第 11 期～第 31 期に発現する Xlim-1、発生ステージ第 20 期以降に発現する Xpax-2、発生ステージ第 22 期以降に発現する XCIRP や XeWT1、発生ステージ第 27 期以降に発現する Na⁺K⁺-ATPase、発生ステージ第 31 期以降に発現する Cap-1 や Xlcaax-1 を例示することができる。

表 1

遺伝子名	発現開始時間	特 徴
初期応答遺伝子		
Mix.1	約 30 分	ホメオボックス遺伝子、ショシヨウハ I の paired に類似
goosecoid	約 30 分	ホメオボックス遺伝子、ショシヨウハ I の gooseberry と bicoid に類似
Xlim-1	約 2 時間	LIM ドメインを持つホメオボックス遺伝子
Xbra	90～250 分	マウスの Brachyury(T) に類似
後期応答遺伝子		
XlHbox 1	約 11 時間	ホメオボックス遺伝子、ショシヨウハ I の antennapedia に類似
XlHbox 6	約 13 時間	ホメオボックス遺伝子、ショシヨウハ I の abdominal-B に類似
Xwnt-8	約 16 時間	癌遺伝子 Wnt-1(int-1) に類似
XMyoD	約 16 時間	マウスの MyoD に類似
a-actin	約 19 時間	心筋と骨格のアクチン遺伝子
N-CAM	約 19 時間	神経細胞接着分子の遺伝子

本発明におけるインビトロでの臓器の誘導は、TGF- β ファミリーの存在下で行うことができる。TGFは形質転換成長因子あるいはトランスフォーミング増殖因子とも呼ばれ、培養環境に添加したとき単独又は他の因子との共同で、細胞の正常な増殖特性をトランスフォーム様の増殖特性に転換させる作用を有し、かかるTGFには、上皮増殖因子(EGF)と受容体を共通するTGF- α と、TGF- α と共同してTGF活性を示すTGF- β がある。そして、TGF- β ファミリーとしては、

TGF- β 、アクチビン、インヒビン、ミューラー管抑制因子などを挙げることができるが、中胚葉誘導活性の点でアクチビンが特に好ましい。

卵巣の顆粒膜細胞などから分泌され、脳下垂体前葉からの卵胞刺激ホルモン (FSH) の分泌を促進させる活性をもつ細胞増殖因子であり、FSH分泌抑制因子作用をもつインヒビン β 鎖のサブユニットがS-S結合したダイマーとして存在している哺乳類のアクチビンは、0.1 ng/ml以上の濃度で予定外胚葉片に中胚葉組織を誘導し、筋アクチンやホメオボックス遺伝子などの中胚葉マーカー遺伝子の発現をひきおこすことができ、いずれのアッセイ系においても腹側から背側にいたるすべての中胚葉組織を誘導できる特徴を有するが、アクチビンの作用は明確に濃度依存的であり、濃度が高くなるに従ってより背側の中胚葉を分化し、およそ0.3~1.0 ng/mlの濃度で処理されたアニマルキャップの内部には血球、体腔上皮、間充織が、5~10 ng/mlの濃度では筋肉が、50~100 ng/mlにおいては最も背側の中胚葉である脊索がそれぞれ分化してくる。

他方、FGF (繊維芽細胞増殖因子) も濃度に応じて血球、間充織、筋肉を分化させるが、高濃度(30~120 ng/ml)でも脊索は誘導できないことから、インビトロでの臓器の誘導は、アクチビン等のTGF- β ファミリーの存在下で行うことが望ましい。また、アクチビン処理した外植体の内部にはしばしば神経組織が観察されるが、これは高濃度のアクチビンによって誘導された形成体が、未分化の細胞に神経誘導をおこなうことで生じると考えられ、これらのことは、アクチビンが単に組織の分化を誘導するのみならず、背腹軸の決定に密接に関わっていることを示している。アクチビンによるアニマルキャップへの器官形成の誘導を図2に示す。

さらに、アクチビンはいくつかの他種の生体内物質との相互作用によ

ってさまざまな器官を誘導することができる（図2参照）。本発明者らによると、ツメガエルのアニマルキャップを適当な濃度のアクチビンとレチノイン酸で処理することによって腎臓の分化を、またアクチビンとBMP（骨形成因子）、もしくはIL-11、SCF (Stem Cell Factor) によって血球の分化をコントロールすることができる。上記図2においてRAで示されるレチノイン酸は、ビタミンA酸とも呼ばれ、ビタミンA（レチノール）の重要な代謝産物であり、動物の正常な発育、上皮組織や軟骨の分化増殖に必須とされ、脊椎動物の発生過程においてモルフォゲン様作用をもち、レチノイン酸受容体を介して遺伝子の発現を制御することによってその作用を発揮する。

以下に、実施例を挙げてこの発明を更に具体的に説明するが、この発明の技術的範囲はこれらの実施例に限定されるものではない。

実施例1

インビトロにおけるアクチビン及び／又はレチノイン酸による外植体の分化パターンについて調べた。アフリカツメガエルの胞胚（発生ステージ第9期）から外胚葉域を切り出し、 10 ng/ml のアクチビン（ヒト組換えアクチビンA）溶液、 10^{-4} M のレチノイン酸（米国シグマ社製「R-2625」）溶液、及びアクチビン 10 ng/ml とレチノイン酸 10^{-4} M を含む混合溶液で3時間処理し、生理食塩水（スタインバーグ溶液）中で4日間培養し、インビトロにおける外植体の分化誘導パターンを調べた。結果を表2に示す。なお、表2中の括弧内の数値は全試料数に対する割合（％）を示す（表3も同じ）。表2から、アクチビン 10 ng/ml とレチノイン酸 10^{-4} M を含む混合溶液で処理したものは、4日目に前腎細管が高頻度で分化し、処理した外胚葉片のうち86％のものが前腎細管を形成した。図3として形成された前腎細管（矢印部分）の写真を示す。また、アクチビン単独処理の場合は、外

胚葉片に筋肉や間充織、体腔上皮、神経組織などが誘導され、無処理及びレチノイン酸単独処理の場合は、何も分化が見られず、外胚葉片は不整形な表皮細胞塊となることがわかる。

実施例 2

インビボ（生体内）におけるアクチビン及び／又はレチノイン酸による外植体（移植片）の分化パターンについては移植法によって調べた。実施例 1 と同様に調製した外植体（0.3 mm × 0.3 mm）をアフリカツメガエルの胚（発生段階第 20 期）左側の前腎原基除去（切除）部分に移植し、5 日後にインビボにおける外植体の分化誘導パターンを調べた。結果を実施例 1 と同様に表 2 に示す。表 2 から、アクチビン 10 ng/ml とレチノイン酸 10^{-4} M を含む混合溶液で処理したものは、4 日目に前腎細管が高頻度で分化し、処理した外胚葉片のうちすべてのものが宿主胚の内部で前腎細管を形成し、アクチビン単独処理の場合は、外胚葉片に筋肉や体腔上皮、表皮などが誘導され、前腎細管に分化したものはごく僅かであり、無処理及びレチノイン酸単独処理の場合は、ほとんど分化が見られず、外胚葉片は宿主胚の表皮の一部を形成することがわかる。なお、前腎細管に分化することは、1 %フルオレセイン-デキストラン-アミンからなる蛍光色素（FDA 製分子プローブ「D-1820」）によって移植片をラベルし、それを追跡することにより確認した。

表 2

	インビトロ				インビボ			
アクチビン A 濃度 (ng/ml)	0		10		0		10	
レチノイン酸濃度 (M)	0	10^{-4}	0	10^{-4}	0	10^{-4}	0	10^{-4}
試料数	37	32	35	37	14	15	23	23
不整形表皮	37 (100)	32 (100)	0	1 (3)	14 (100)	15 (100)	0	0
表皮	0	0	34 (97)	35 (95)	0	0	6 (26)	8 (35)
神経組織	0	0	28 (80)	2 (5)	0	0	1 (4)	0
筋肉	0	0	32 (91)	2 (5)	0	0	16 (70)	0
前腎細管	0	0	0	32 (86)	0	0	4 (17)	23 (100)
間充織	0	0	27 (77)	7 (19)	0	0	0	0
体腔上皮	0	0	3 (86)	7 (19)	0	0	10 (43)	8 (35)
腸	0	0	0	0	1 (7)	1 (7)	8 (35)	4 (17)

実施例 3

実施例 1 記載の方法により、インビトロでアクチビンとレチノイン酸の混合溶液を用いて分化誘導した、発生ステージ第 20 期に応じて発現するゲノム DNA である XPax-2 を分子マーカーとして検出した発生ステージ第 20 期と検定された前腎細管に分化する外胚葉片を、発生ステージ第 20 期、第 23 期及び第 25 期の段階で、あらかじめ左右の前腎原基（第 3 ～ 第 5 体節の下方に存在）を摘出除去したアフリカツメガエルの胚の除去部位片側に移植し、生体内で機能することができるかどうかを調べた。移植の概要を図 4 に示す。なお、対照として、移植することなく左右の前腎原基を摘出除去したアフリカツメガエルを用いた。結果を表 3 に示す。

表 3

ステージ	2 0		2 3		2 5	
	対照	移植	対照	移植	対照	移植
試料数	96	141	36	48	10	19
正常胚	7 (7)	29 (21)	1 (3)	4 (8)	0	1 (5)
水腫胚	89 (93)	112 (79)	35 (97)	44 (92)	10 (100)	18 (95)

表 3 から、発生ステージ第 2 0 期に移植した場合には 1 4 1 例のうち 2 9 例（2 1 %）が、発生ステージ第 2 3 期に移植した場合には 4 8 例のうち 4 例（8 %）が、発生ステージ第 2 5 期に移植した場合には 1 9 例のうち 1 例（5 %）が、水腫を形成せずに正常に発生し、移植された前腎が排出器官として機能し、水腫の形成を抑えたのに対し、対照である左右の前腎原基を摘出除去された胚は、発生ステージ第 2 0 期では 9 6 例のうち 7 例（7 %）が、発生ステージ第 2 3 期では 3 6 例のうち 1 例（3 %）が水腫を形成せずに正常に発生したにすぎず、発生ステージ第 2 5 期では 1 0 例のうちすべてが水分排出できずに水腫を形成していた。図 5 に正常に発生したオタマジャクシ（写真下）と、水腫を形成したオタマジャクシ（写真上）の写真を示す。

また、発生ステージ第 2 0 期における移植又は摘出除去の術後の経過日数と生存率との関係を図 6 に示す。図 6 より、移植することなく摘出除去した場合には、水腫を形成して 9 日以内に死亡するが、移植した場合には、上記のように 1 4 1 例のうち 2 9 例（2 1 %）が水腫を形成せずに正常に発生し、そのうち数例が一ヶ月以上生存することがわかる。

アカガエル科のラナ・ダルマティナ（*Rana dalmatina*）を用いた実験でも知られているように、初期胚から左右の前腎原基を除去すると、除去胚は水分排出ができずに水腫（edema）を形成する。上記実施例 3 の移植試験において、発生ステージ第 2 0 期～第 2 5 期までの胚の第 3

～第5体節の下部にある前腎原基を摘出除去した胚に、アクチビン／レチノイン酸処理した発生ステージ第20期～第25期の外胚葉片を移植し、水腫形成が抑えられるという結果が得られたことから、移植片が前腎すなわち排出器官として機能したと判断できる。発生ステージ第20期に移植されたものに比べて、発生ステージ第23期以降に移植手術を行った場合には、正常に発生したものは著しく少なく、このことは、移植を行う時期が非常に重要な要素であり、後期のステージ（ステージ25）を用いると、宿主に対する移植用臓器の適応性が著しく低下することがわかった。

産業上の利用可能性

本発明によると、アクチビンあるいはアクチビンとレチノイン酸等の中胚葉誘導因子として用いた比較的簡単な実験系で臓器をインビトロで誘導することができ、このインビトロ誘導臓器を被臓器移植動物の発生ステージに応じた所定の発生ステージまで培養することにより、同種の被臓器移植動物の生体内に移植した際に生体内で機能することができる臓器を調製することができ、また、インビトロで誘導した臓器を、同種の被臓器移植動物の発生ステージに応じた所定の発生ステージまで培養した後生体内に移植することにより、インビトロで誘導した臓器が移植用臓器として適しているかどうかを評価することができる。

また、本発明によると、インビトロで誘導された臓器が実際に生体内で機能することを確認することができるので、腎臓等の臓器の形成の仕組みを解明する上で多くの有用な知見を得ることができるばかりでなく、インビトロでの臓器形成とその生体への移植という発生工学あるいは臓器工学の新たな分野の確立にも貢献することができる。さらに、本発明によると、免疫的に適合した臓器の移植が可能となり、ヒトを含めた高

等動物の腎疾患等の各種疾病に対して治療の道を拓くことができる。

請 求 の 範 囲

1. インビトロで誘導した臓器を同種の被臓器移植動物の生体内に移植した際に生体内で機能することができる臓器の調製方法であって、被臓器移植動物の発生ステージに応じた所定の発生ステージまで該臓器を培養することを特徴とする移植用インビトロ誘導臓器の調製方法。
2. 被臓器移植動物の発生ステージに応じた所定の発生ステージが、被臓器移植動物と同じ発生ステージであることを特徴とする請求項1記載の移植用インビトロ誘導臓器の調製方法。
3. 所定の発生ステージを、インビトロで誘導した臓器の発生ステージに応じて発現するゲノムDNAを分子マーカーとして検定することを特徴とする請求項1又は2記載の移植用インビトロ誘導臓器の調製方法。
4. インビトロで誘導した臓器が、胞胚から切除した外胚葉域から誘導した臓器であることを特徴とする請求項1～3のいずれか記載の移植用インビトロ誘導臓器の調製方法。
5. インビトロでの誘導が、TGF（形質転換成長因子）- β ファミリーの存在下で行われることを特徴とする請求項1～4のいずれか記載の移植用インビトロ誘導臓器の調製方法。
6. TGF（形質転換成長因子）- β ファミリーが、アクチビンであることを特徴とする請求項5記載の移植用インビトロ誘導臓器の調製方法。
7. インビトロでの誘導が、アクチビン及びレチノイン酸の存在下で行われることを特徴とする請求項1～4のいずれか記載の移植用インビトロ誘導臓器の調製方法。
8. 臓器が、腎臓、心臓、脾臓、肝臓、腸管、脊索、骨格筋、白血球、赤血球、リンパ球から選ばれることを特徴とする請求項1～7のいずれか記載の移植用インビトロ誘導臓器の調製方法。

9. 被臓器移植動物の生体が、胚であることを特徴とする請求項1～8のいずれか記載の移植用インビトロ誘導臓器の調製方法。

10. 被臓器移植動物が、脊椎動物であることを特徴とする請求項1～9のいずれか記載の移植用インビトロ誘導臓器の調製方法。

11. 請求項1～10のいずれか記載の移植用インビトロ誘導臓器の調製方法により調製することを特徴とするインビトロで誘導された移植用臓器。

12. インビトロで誘導した非ヒト動物の臓器を、同種の被臓器移植非ヒト動物の生体内に移植することを特徴とするインビトロで誘導した非ヒト動物の臓器の評価方法。

13. インビトロで誘導した非ヒト動物の臓器を、同種の被臓器移植非ヒト動物の発生ステージに応じた所定の発生ステージまで培養し、該培養後の臓器を被臓器移植動物の生体内に移植することを特徴とするインビトロで誘導した非ヒト動物の臓器の評価方法。

14. 所定の発生ステージを、インビトロで誘導した臓器の発生ステージに応じて発現するゲノムDNAを分子マーカーとして検定することを特徴とする請求項13記載のインビトロで誘導した非ヒト動物の臓器の評価方法。

15. インビトロで誘導した臓器が、胞胚から切除した外胚葉域から誘導した臓器であることを特徴とする請求項13又は14のいずれか記載のインビトロで誘導した非ヒト動物の臓器の評価方法。

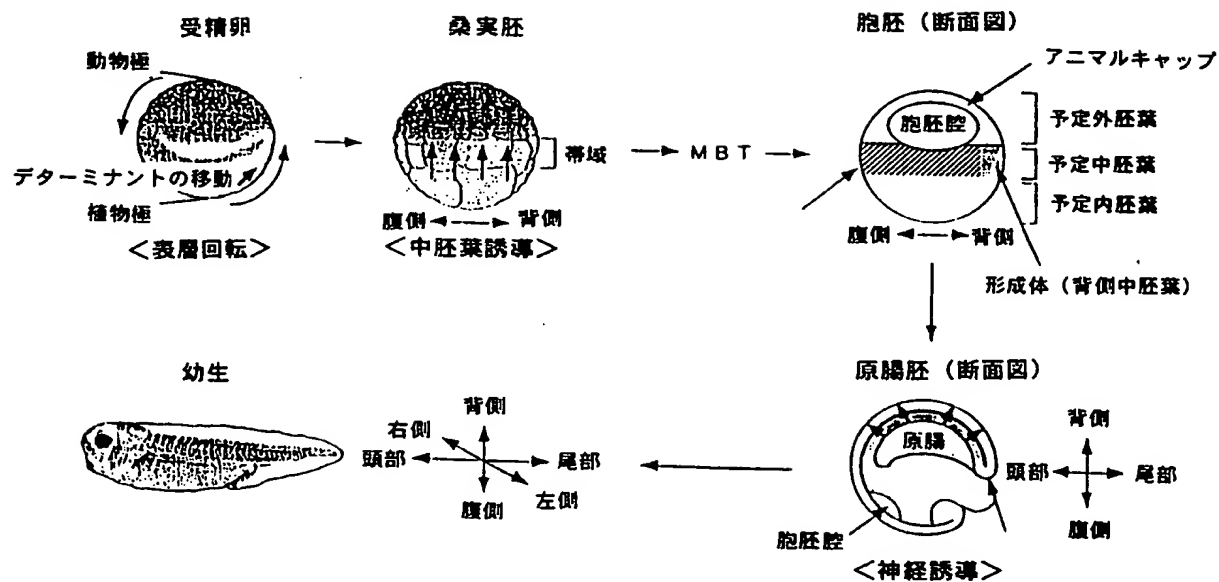
16. インビトロでの誘導が、TGF（形質転換成長因子）- β ファミリーの存在下で行われることを特徴とする請求項13～15のいずれか記載のインビトロで誘導した非ヒト動物の臓器の評価方法。

17. 臓器が、腎臓、心臓、脾臓、肝臓、腸管、脊索、骨格筋、白血球、赤血球、リンパ球から選ばれることを特徴とする請求項13～16のい

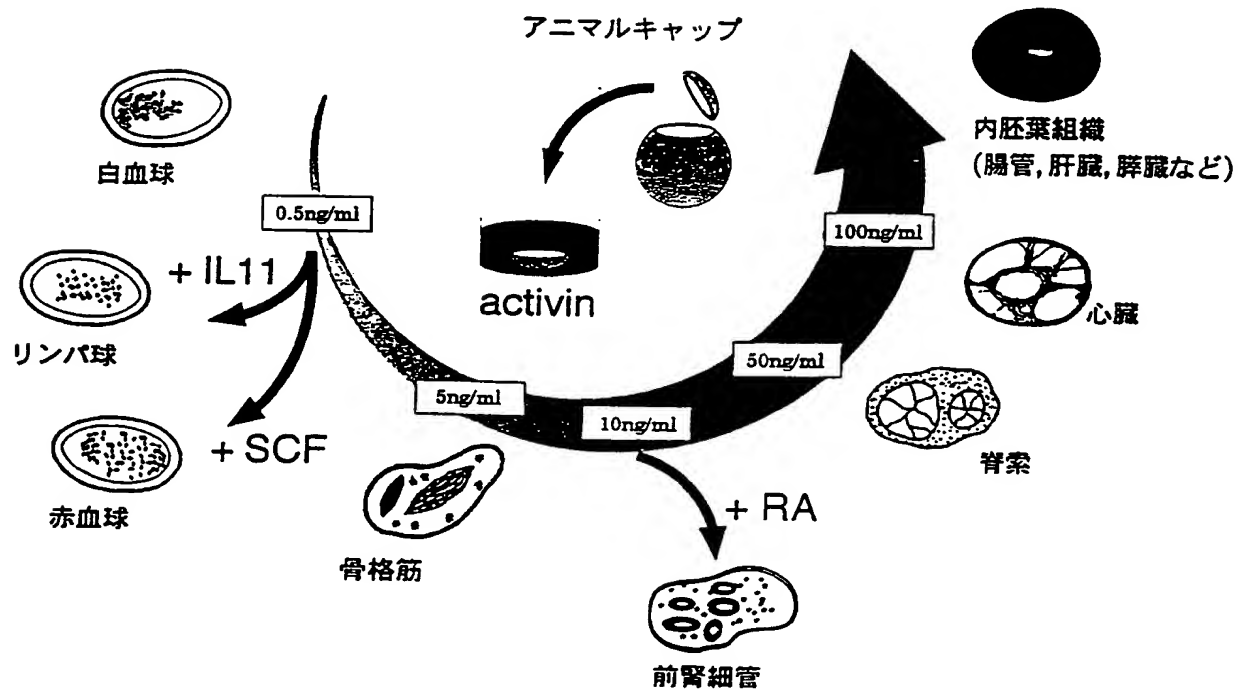
ずれか記載のインビトロで誘導した非ヒト動物の臓器の評価方法。



第 1 図

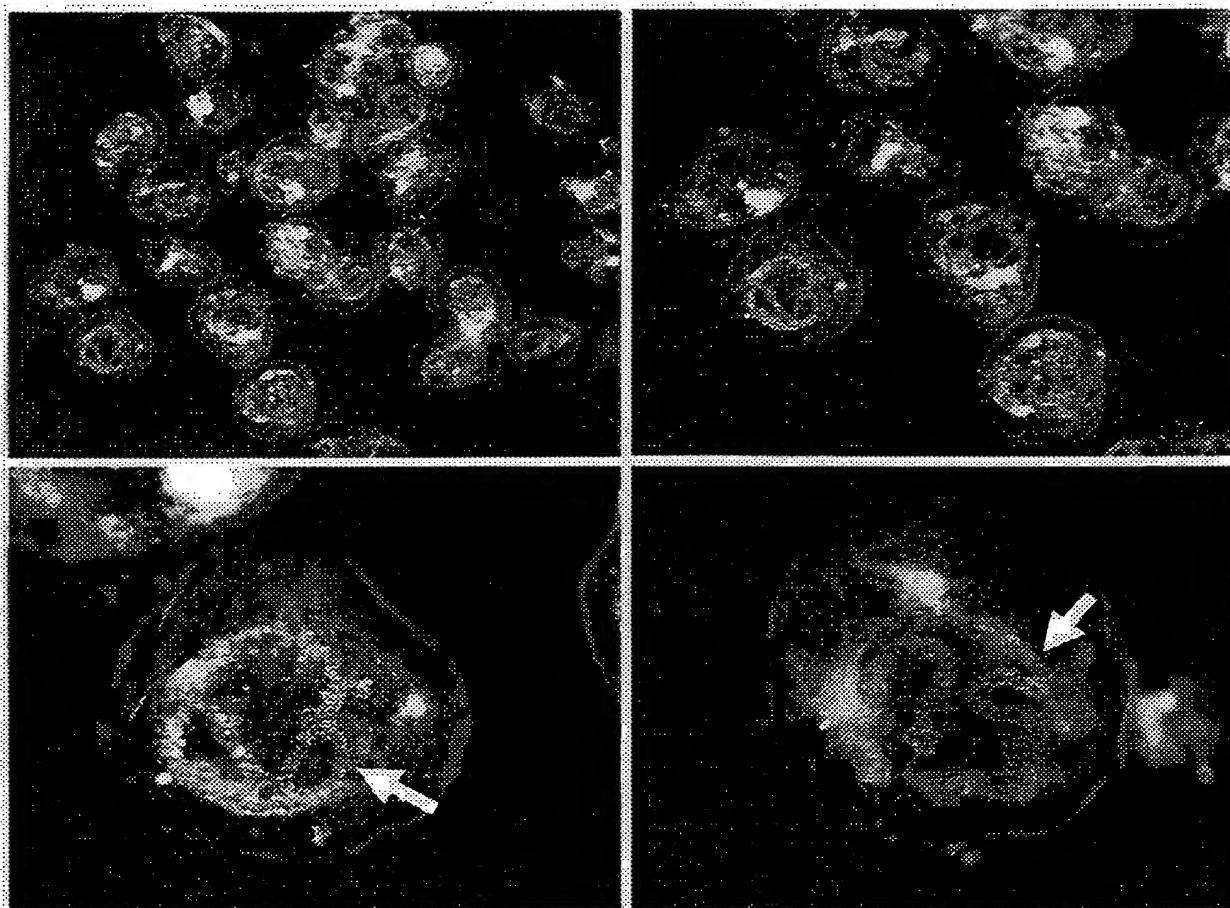


第 2 図



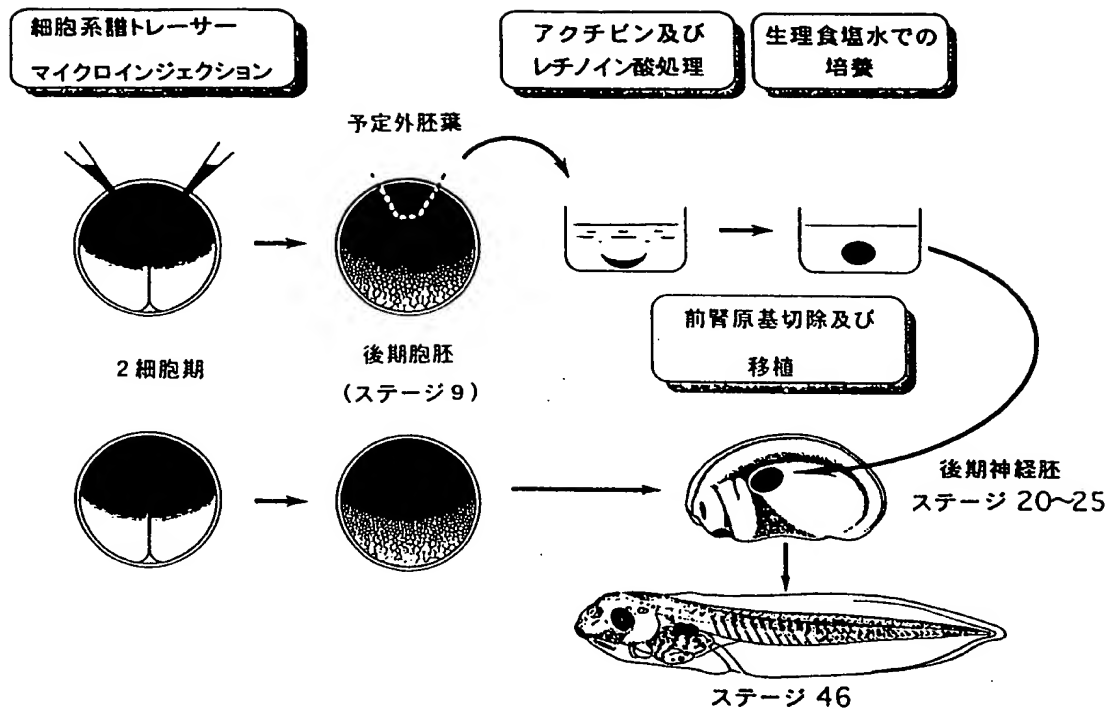


第 3 図





第 4 図

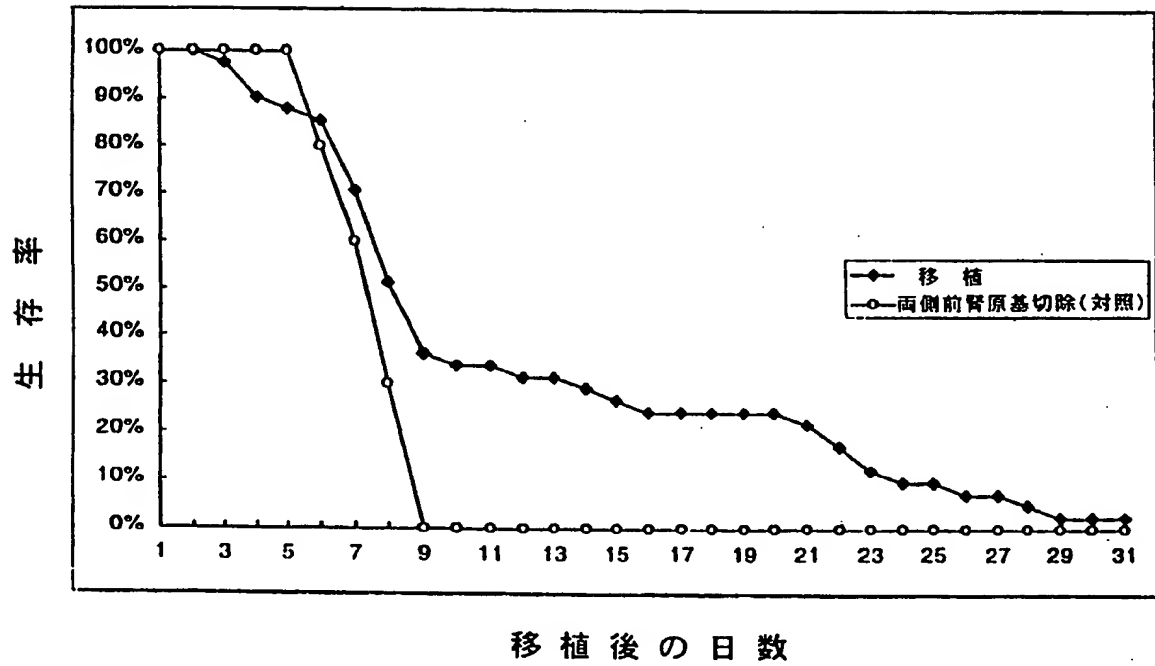


第 5 図





第6図





INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP00/00148

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
Int.Cl.⁷ C12N 5/06

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

Int.Cl.⁷ C12N 5/06

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)
JICST (JOIS) , MEDLINE (STN)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
PX	Naomi Moriya, et al., "Formation and Transplantation of Artificial Organ using the Early Embryo of Amphibia induced in Vitro" (in Japanese), BIO INDUSTRY (1999), Vol.16 , No.6, p.12-19	1-17
PX	Chan T C et al., "A model system for organ engineering transplantation of in vitro induced embryonic kidney", MEDLINE Acc.No.1999288549 & BATURWISSENSCHAFTIN (1999 May), Vol.86, No.5, p.224-227	1-17
X	Taketo Kouzuki, et al., "Creating Pancreas Cells β and Hepatocytes having Specific Function; An Approach to Hybrid Type Artificial Organ" (in Japanese), Pathophysiology (Byotai Seiri) (1990), Vol.9, No.11, p.925-927	12
X	JP, 3-147782, A (Bio Material Kenkyusho K.K.), 24 June, 1991 (24.06.91) (Family: none)	12
A	JP, 6-277050, A (Kanegafuchi Chem. Ind. Co., Ltd.), 04 October, 1994 (04.10.94) (Family: none)	1-17

☐ Further documents are listed in the continuation of Box C.

☐ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:	"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance	"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
"E" earlier document but published on or after the international filing date	"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)	"&" document member of the same patent family
"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means	
"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed	

Date of the actual completion of the international search
05 April, 2000 (05.04.00)

Date of mailing of the international search report
18 April, 2000 (18.04.00)

Name and mailing address of the ISA/
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

Box I Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 1 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☐ Claims Nos.:
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
2. ☐ Claims Nos.:
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:
3. ☐ Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box II Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 2 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.
3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4. ☐ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

Remark on Protest

The additional search fees were accompanied by the applicant's protest.



No protest accompanied the payment of additional search fees.

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))

Int.Cl¹ C12N 5/06

B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))

Int.Cl¹ C12N 5/06

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)

JICSTファイル(JOIS), MEDLINE(STN)

C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
P X	盛屋 直美 他, “両生類の初期胚を用いた試験管内での人工臓器の形成と移植”, BIO INDUSTRY (1999), Vol.16, No.6, p.12-19	1-17
P X	Chan T C et al., “A model system for organ engineering transplantation of in vitro induced embryonic kidney”, MEDLINE Acc.No.1999288549 & BATURWISSENSCHAFTIN (1999 May), Vol.86, No.5, p.224-227	1-17
X	香月 武人 他, “ハイブリッド型人工臓器へのアプローチ -分化機能を有する膵β細胞ならびに肝細胞株の樹立-”, 病態生理 (1990), Vol.9, No.11, p.925-927	12

☒ C欄の続きにも文献が列挙されている。☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。

* 引用文献のカテゴリー

- 「A」 特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの
「E」 国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの
「L」 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)
「O」 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献
「P」 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

- の日の後に公表された文献
「T」 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの
「X」 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの
「Y」 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの
「&」 同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

05.04.00

国際調査報告の発送日

18.04.00

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA/J P)

郵便番号100-8915

東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官 (権限のある職員)

新見 浩一

4N

9162

電話番号 03-3581-1101 内線 3488

C (続き) . 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
X	JP, 3-147782, A (株式会社バイオマテリアル研究所) 24. 6月. 1991 (24. 06. 91) ファミリーなし	1 2
A	JP, 6-277050, A (鐘淵化学工業株式会社) 4. 10月. 1994 (04. 10. 94) ファミリーなし	1 - 1 7

第Ⅰ欄 請求の範囲の一部の調査ができないときの意見 (第1ページの2の続き)

法第8条第3項 (PCT17条(2)(a)) の規定により、この国際調査報告は次の理由により請求の範囲の一部について作成しなかった。

1. ☐ 請求の範囲 _____ は、この国際調査機関が調査をすることを要しない対象に係るものである。つまり、
2. ☐ 請求の範囲 _____ は、有意義な国際調査をすることができる程度まで所定の要件を満たしていない国際出願の部分に係るものである。つまり、
3. ☐ 請求の範囲 _____ は、従属請求の範囲であってPCT規則6.4(a)の第2文及び第3文の規定に従って記載されていない。

第Ⅱ欄 発明の単一性が欠如しているときの意見 (第1ページの3の続き)

次に述べるようにこの国際出願に二以上の発明があるとこの国際調査機関は認めた。

1. ☐ 出願人が必要な追加調査手数料をすべて期間内に納付したので、この国際調査報告は、すべての調査可能な請求の範囲について作成した。
2. ☐ 追加調査手数料を要求するまでもなく、すべての調査可能な請求の範囲について調査することができたので、追加調査手数料の納付を求めなかった。
3. ☐ 出願人が必要な追加調査手数料を一部のみしか期間内に納付しなかったので、この国際調査報告は、手数料の納付のあった次の請求の範囲のみについて作成した。
4. ☐ 出願人が必要な追加調査手数料を期間内に納付しなかったので、この国際調査報告は、請求の範囲の最初に記載されている発明に係る次の請求の範囲について作成した。

追加調査手数料の異議の申立てに関する注意

- ☒ 追加調査手数料の納付と共に出願人から異議申立てがあった。
☐ 追加調査手数料の納付と共に出願人から異議申立てがなかった。



1
2
3

4
5
6

PCT

国際予備審査報告

(法第12条、法施行規則第56条)
〔PCT36条及びPCT規則70〕

REC'D 26 JAN 2001

WIPO

PCT

AD

出願人又は代理人 の書類記号 A021-04PCT	今後の手続きについては、国際予備審査報告の送付通知（様式PCT/ IPEA/416）を参照すること。	
国際出願番号 PCT/JPO0/00148	国際出願日 (日.月.年) 14.01.00	優先日 (日.月.年) 29.01.99
国際特許分類 (IPC) Int.Cl. C12N 5/06		
出願人 (氏名又は名称) 科学技術振興事業団		

1. 国際予備審査機関が作成したこの国際予備審査報告を法施行規則第57条 (PCT36条) の規定に従い送付する。
2. この国際予備審査報告は、この表紙を含めて全部で 4 ページからなる。
- ☐ この国際予備審査報告には、附属書類、つまり補正されて、この報告の基礎とされた及び/又はこの国際予備審査機関に対してした訂正を含む明細書、請求の範囲及び/又は図面も添付されている。
(PCT規則70.16及びPCT実施細則第607号参照)
この附属書類は、全部で ページである。
3. この国際予備審査報告は、次の内容を含む。
- I ☒ 国際予備審査報告の基礎
- II ☐ 優先権
- III ☐ 新規性、進歩性又は産業上の利用可能性についての国際予備審査報告の不作成
- IV ☐ 発明の単一性の欠如
- V ☒ PCT35条(2)に規定する新規性、進歩性又は産業上の利用可能性についての見解、それを裏付けるための文献及び説明
- VI ☐ ある種の引用文献
- VII ☐ 国際出願の不備
- VIII ☒ 国際出願に対する意見

国際予備審査の請求書を受理した日 27.06.00	国際予備審査報告を作成した日 12.01.01	
名称及びあて先 日本国特許庁 (IPEA/JP) 郵便番号100-8915 東京都千代田区霞が関三丁目4番3号	特許庁審査官 (権限のある職員) 上 條 肇	4N 9839
電話番号 03-3581-1101 内線 3488		

様式PCT/IPEA/409 (表紙) (1998年7月)



I. 国際予備審査報告の基礎

1. この国際予備審査報告は下記の出願書類に基づいて作成された。(法第6条(PCT14条)の規定に基づく命令に
 応答するために提出された差し替え用紙は、この報告書において「出願時」とし、本報告書には添付しない。
 PCT規則70.16, 70.17)

☒ 出願時の国際出願書類

- ☐ 明細書 第 _____ ページ、 出願時に提出されたもの
 明細書 第 _____ ページ、 国際予備審査の請求書と共に提出されたもの
 明細書 第 _____ ページ、 _____ 付の書簡と共に提出されたもの
- ☐ 請求の範囲 第 _____ 項、 出願時に提出されたもの
 請求の範囲 第 _____ 項、 PCT19条の規定に基づき補正されたもの
 請求の範囲 第 _____ 項、 国際予備審査の請求書と共に提出されたもの
 請求の範囲 第 _____ 項、 _____ 付の書簡と共に提出されたもの
- ☐ 図面 第 _____ ページ/図、 出願時に提出されたもの
 図面 第 _____ ページ/図、 国際予備審査の請求書と共に提出されたもの
 図面 第 _____ ページ/図、 _____ 付の書簡と共に提出されたもの
- ☐ 明細書の配列表の部分 第 _____ ページ、 出願時に提出されたもの
 明細書の配列表の部分 第 _____ ページ、 国際予備審査の請求書と共に提出されたもの
 明細書の配列表の部分 第 _____ ページ、 _____ 付の書簡と共に提出されたもの

2. 上記の出願書類の言語は、下記に示す場合を除くほか、この国際出願の言語である。

上記の書類は、下記の言語である _____ 語である。

- ☐ 国際調査のために提出されたPCT規則23.1(b)にいう翻訳文の言語
☐ PCT規則48.3(b)にいう国際公開の言語
☐ 国際予備審査のために提出されたPCT規則55.2または55.3にいう翻訳文の言語

3. この国際出願は、ヌクレオチド又はアミノ酸配列を含んでおり、次の配列表に基づき国際予備審査報告を行った。

- ☐ この国際出願に含まれる書面による配列表
☐ この国際出願と共に提出されたフレキシブルディスクによる配列表
☐ 出願後に、この国際予備審査(または調査)機関に提出された書面による配列表
☐ 出願後に、この国際予備審査(または調査)機関に提出されたフレキシブルディスクによる配列表
☐ 出願後に提出した書面による配列表が出願時における国際出願の開示の範囲を超える事項を含まない旨の陳述書の提出があった
☐ 書面による配列表に記載した配列とフレキシブルディスクによる配列表に記載した配列が同一である旨の陳述書の提出があった。

4. 補正により、下記の書類が削除された。

- ☐ 明細書 第 _____ ページ
☐ 請求の範囲 第 _____ 項
☐ 図面 図面の第 _____ ページ/図

5. ☐ この国際予備審査報告は、補充欄に示したように、補正が出願時における開示の範囲を越えてされたものと認められるので、その補正がされなかったものとして作成した。(PCT規則70.2(c) この補正を含む差し替え用紙は上記1.における判断の際に考慮しなければならない、本報告に添付する。)



V. 新規性、進歩性又は産業上の利用可能性についての法第12条(PCT35条(2))に定める見解、それを裏付ける文献及び説明

1. 見解

新規性(N)

請求の範囲

1-17

有

請求の範囲

無

進歩性(IS)

請求の範囲

1-11, 13-17

有

請求の範囲

12

無

産業上の利用可能性(IA)

請求の範囲

1-17

有

請求の範囲

無

2. 文献及び説明(PCT規則70.7)

【請求項12について】

引用文献1: 香月 武人 他, “ハイブリッド型人工臓器へのアプローチ
-分化機能を有する膵β細胞ならびに肝細胞株の樹立-”,
病態生理(1990), Vol.9, No.11, p.925-927

引用文献2: JP, 3-147782, A (株式会社バイオマテリアル研究所)
24.6月.1991 (24.06.91)

引用文献1、2には、インビトロで誘導した非ヒト動物の臓器を、同種の被臓器移植非ヒト動物の生体内に移植するインビトロで誘導した非ヒト動物臓器の評価方法について記載されている。

人工臓器を得るために、骨髄細胞をインビトロで誘導し、各臓器を作成すること、未分化細胞を分化させて臓器を得ようとすることは、本願優先日前において周知であったと認められることから、引用文献1、2に記載される“人工臓器をインビトロにおいて誘導する”際に、そのインビトロで誘導した臓器の評価方法を、未分化細胞から得られる臓器の評価方法にも適用することは、当業者が容易に想到しうるものと認める。

また、本願請求項12に係る発明の効果も、当業者が予測しうる程度のものであると認められる。



Ⅶ. 国際出願に対する意見

請求の範囲、明細書及び図面の明瞭性又は請求の範囲の明細書による十分な裏付についての意見を次に示す。

【請求項 1 乃至 17 について】

本願請求項 1、2、9、10 には、「被臓器移植動物」、請求項 8、17 には「臓器」、請求項 13、15、17 には「非ヒト動物の臓器」について記載されている。

しかし、本願明細書において実施例をもって具体的に分化させた動物、臓器は、「アフリカツメガエルの前腎細管、筋肉、間充織、体腔上皮、神経組織」のみである。また、本願明細書中の実施の様態には、分化させた「被臓器移植動物」として、「魚類、鳥類、マウス等の哺乳動物などの非ヒト動物、ヒト」、「臓器」として、「心臓、脾臓、肝臓、腸管、脊索、骨格、白血球、赤血球、リンパ球」が特に例示されているのみであり、これらの「被臓器移植動物」において様々な「臓器」を分化させる具体的な手段について何ら記載されていない。

ところで、本願優先日当時の技術常識を検討するに、臓器のインビトロでの分化誘導において、実際には、人工肝臓はまだ作成されていないこと（要すれば、人工臓器(1998)、Vol. 27, No. 5, p. 724-732 参照）、ツメガエルにおいて、未分化細胞から腎臓、前腎を作成されるものの、この実験をヒトを含めた高等な動物に応用するにはまだまだ多くのステップがあること（要すれば、本願発明者論文 科学(1999. June), Vol. 69, No. 6, p. 529-536 参照）が認められる。

したがって、本願請求項 1 乃至 17 における「被臓器移植動物」、「非ヒト動物の臓器」、「臓器」には多くの動物種、臓器が考えられることから、それらの動物、非動物、臓器の中から本願明細書中に記載され明確に確認できる程の顕著な効果を有する“全ての動物、非ヒト動物の未分化細胞から分化させた様々な臓器”を得るためには、当業者といえども過度の実験を本願明細書中に記載され明確に確認できる程の顕著な効果を有する“全ての動物、非ヒト動物の未分化細胞から分化させた様々な臓器”を得るためには、当業者といえども過度の実験を要すると認められる。

したがって、発明の詳細な説明には、当業者が請求項 1 乃至 17 に係る発明を実施することができ程度に発明の構成が記載されていると認めることができない。



3T
Translation

PATENT COOPERATION TREATY

PCT

INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

(PCT Article 36 and Rule 70)

Applicant's or agent's file reference A021-04PCT	FOR FURTHER ACTION See Notification of Transmittal of International Preliminary Examination Report (Form PCT/IPEA/416)	
International application No. PCT/JP00/00148	International filing date (day/month/year) 14 January 2000 (14.01.00)	Priority date (day/month/year) 29 January 1999 (29.01.99)
International Patent Classification (IPC) or national classification and IPC C12N 5/06		
Applicant JAPAN SCIENCE AND TECHNOLOGY CORPORATION		

1. This international preliminary examination report has been prepared by this International Preliminary Examining Authority and is transmitted to the applicant according to Article 36.	
2. This REPORT consists of a total of <u>4</u> sheets, including this cover sheet.	
<input type="checkbox"/> This report is also accompanied by ANNEXES, i.e., sheets of the description, claims and/or drawings which have been amended and are the basis for this report and/or sheets containing rectifications made before this Authority (see Rule 70.16 and Section 607 of the Administrative Instructions under the PCT).	
These annexes consist of a total of _____ sheets.	
3. This report contains indications relating to the following items:	
I	<input checked="" type="checkbox"/> Basis of the report
II	<input type="checkbox"/> Priority
III	<input type="checkbox"/> Non-establishment of opinion with regard to novelty, inventive step and industrial applicability
IV	<input type="checkbox"/> Lack of unity of invention
V	<input checked="" type="checkbox"/> Reasoned statement under Article 35(2) with regard to novelty, inventive step or industrial applicability; citations and explanations supporting such statement
VI	<input type="checkbox"/> Certain documents cited
VII	<input type="checkbox"/> Certain defects in the international application
VIII	<input checked="" type="checkbox"/> Certain observations on the international application

Date of submission of the demand 27 June 2000 (27.06.00)	Date of completion of this report 12 January 2001 (12.01.2001)
Name and mailing address of the IPEA/JP	Authorized officer
Facsimile No.	Telephone No.



INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

International application No.

PCT/JP00/00148

I. Basis of the report

1. With regard to the **elements** of the international application:*

- ☒ the international application as originally filed
- ☐ the description:
pages _____, as originally filed
pages _____, filed with the demand
pages _____, filed with the letter of _____
- ☐ the claims:
pages _____, as originally filed
pages _____, as amended (together with any statement under Article 19
pages _____, filed with the demand
pages _____, filed with the letter of _____
- ☐ the drawings:
pages _____, as originally filed
pages _____, filed with the demand
pages _____, filed with the letter of _____
- ☐ the sequence listing part of the description:
pages _____, as originally filed
pages _____, filed with the demand
pages _____, filed with the letter of _____

2. With regard to the **language**, all the elements marked above were available or furnished to this Authority in the language in which the international application was filed, unless otherwise indicated under this item.

These elements were available or furnished to this Authority in the following language _____ which is:

- ☐ the language of a translation furnished for the purposes of international search (under Rule 23.1(b)).
- ☐ the language of publication of the international application (under Rule 48.3(b)).
- ☐ the language of the translation furnished for the purposes of international preliminary examination (under Rule 55.2 and/or 55.3).

3. With regard to any **nucleotide and/or amino acid sequence** disclosed in the international application, the international preliminary examination was carried out on the basis of the sequence listing:

- ☐ contained in the international application in written form.
- ☐ filed together with the international application in computer readable form.
- ☐ furnished subsequently to this Authority in written form.
- ☐ furnished subsequently to this Authority in computer readable form.
- ☐ The statement that the subsequently furnished written sequence listing does not go beyond the disclosure in the international application as filed has been furnished.
- ☐ The statement that the information recorded in computer readable form is identical to the written sequence listing has been furnished.

4. ☐ The amendments have resulted in the cancellation of:

- ☐ the description, pages _____
- ☐ the claims, Nos. _____
- ☐ the drawings, sheets/fig _____

5. ☐ This report has been established as if (some of) the amendments had not been made, since they have been considered to go beyond the disclosure as filed, as indicated in the Supplemental Box (Rule 70.2(c)).**

* Replacement sheets which have been furnished to the receiving Office in response to an invitation under Article 14 are referred to in this report as "originally filed" and are not annexed to this report since they do not contain amendments (Rule 70.16 and 70.17).

** Any replacement sheet containing such amendments must be referred to under item 1 and annexed to this report.



INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

International application No.
PCT/JP00/00148**V. Reasoned statement under Article 35(2) with regard to novelty, inventive step or industrial applicability; citations and explanations supporting such statement**

1. Statement

Novelty (N)	Claims	1-17	YES
	Claims		NO
Inventive step (IS)	Claims	1-11,13-17	YES
	Claims	12	NO
Industrial applicability (IA)	Claims	1-17	YES
	Claims		NO

2. Citations and explanations

Claim 12

Document 1: Taketo Kouzuki et al., "Creating pancreas β cells and hepatocytes having specific functions: An approach to hybrid-type artificial organs (in Japanese), Pathophysiology (Byotai Seiri) Vol. 9, No. 11, 1990, p. 925-927

Document 2: JP, 3-147782, A (Bio Material Kenkyusho K.K.) 24 June 1991 (24.06.91)

Documents 1 and 2 describe nonhuman animal organs induced *in vitro* and a method for evaluating nonhuman animal organs induced *in vitro* that are transplanted into the bodies of nonhuman animal organ transplantation recipients of the same species.

This examination finds that inducing bone marrow cells *in vitro* to obtain artificial organs, preparing various organs, and attempting to obtain organs by causing undifferentiated cells to differentiate were well-known techniques prior to the priority date of this application. Therefore, persons skilled in the art can easily conceive of applying the evaluation method for organs induced *in vitro* in the process of "inducing artificial organs *in vitro*" described in documents 1 and 2 as the evaluation method for organs obtained from undifferentiated cells.

In addition, this examination finds that the advantage of the invention set forth in Claim 12 can easily be predicted by persons skilled in the art.



VIII. Certain observations on the international application

The following observations on the clarity of the claims, description, and drawings or on the question whether the claims are fully supported by the description, are made:

Claims 1-17

Claims 1, 2, 9, and 10 set forth "organ transplantation recipient animals," Claims 8 and 17 set forth "organs," and Claims 13, 15, and 17 set forth "organs of nonhuman animals."

However, the animals and organs specifically differentiated in the Experimental Examples in the Specification of this application are only the "pronephros tubule, muscle, mesenchyme, celomic epithelium, and nerve tissue of *Xenopus laevis*." In addition, the only specific examples of differentiated "organ transplantation recipient animals" are "nonhuman animals such as fish, birds, and mammals such as mice and the like, and humans," and the only specific examples of "organs" are "heart, pancreas, liver, intestine, notochord, bone, leukocytes, erythrocytes, and lymphocytes." However, no specific means whatsoever are set forth for differentiating the various "organs" in these "organ transplantation recipient animals."

However, when we look at technical knowledge on the priority date of this application, we find that human organs have actually not been prepared by the induction of differentiation of organs *in vitro* [see Artificial Organs (Jinkou Zouki) Vol. 27, No. 5, 1998, p. 724-732 (in Japanese)], and although kidney and pronephros have been prepared from undifferentiated cells in *Xenopus laevis*, many steps are still necessary until these experiments can be adapted to higher animals such as humans [see the article by the inventors in Science (Kagaku) Vol. 69, No. 6, June 1999, p. 529-536 (in Japanese)].

Therefore, because the "organ transplantation recipient animals," "organs of nonhuman animals," and "organs" set forth in Claims 1-17 of this application include many animal species and organs, this examination finds that even persons skilled in the art would require excessive experimentation to obtain from animals, non-animals and organs "the various organs that are differentiated from the undifferentiated cells of all animals and nonhuman animals" that have been set forth in this application and that have a clearly verifiable pronounced effect.

Therefore, this examination finds that the detailed description of this invention does not set forth an inventive constitution to the extent that persons skilled in the art can work the inventions set forth in Claims 1-17.



PCT COOPERATION TREATY

PCT

NOTIFICATION CONCERNING
SUBMISSION OR TRANSMITTAL
OF PRIORITY DOCUMENT

(PCT Administrative Instructions, Section 411)

From the INTERNATIONAL BUREAU

To:

HIROTA, Masanori
Akasakaaoi Building No. 11
Room 502
8-11, Akasaka 2-chome
Minato-ku, Tokyo 107-0052
JAPON

Date of mailing (day/month/year) 04 April 2000 (04.04.00)	
Applicant's or agent's file reference A021-04PCT	IMPORTANT NOTIFICATION
International application No. PCT/JP00/00148	International filing date (day/month/year) 14 January 2000 (14.01.00)
International publication date (day/month/year) Not yet published	Priority date (day/month/year) 29 January 1999 (29.01.99)
Applicant JAPAN SCIENCE AND TECHNOLOGY CORPORATION et al	

1. The applicant is hereby notified of the date of receipt (except where the letters "NR" appear in the right-hand column) by the International Bureau of the priority document(s) relating to the earlier application(s) indicated below. Unless otherwise indicated by an asterisk appearing next to a date of receipt, or by the letters "NR", in the right-hand column, the priority document concerned was submitted or transmitted to the International Bureau in compliance with Rule 17.1(a) or (b).
2. This updates and replaces any previously issued notification concerning submission or transmittal of priority documents.
3. An asterisk(*) appearing next to a date of receipt, in the right-hand column, denotes a priority document submitted or transmitted to the International Bureau but not in compliance with Rule 17.1(a) or (b). In such a case, the attention of the applicant is directed to Rule 17.1(c) which provides that no designated Office may disregard the priority claim concerned before giving the applicant an opportunity, upon entry into the national phase, to furnish the priority document within a time limit which is reasonable under the circumstances.
4. The letters "NR" appearing in the right-hand column denote a priority document which was not received by the International Bureau or which the applicant did not request the receiving Office to prepare and transmit to the International Bureau, as provided by Rule 17.1(a) or (b), respectively. In such a case, the attention of the applicant is directed to Rule 17.1(c) which provides that no designated Office may disregard the priority claim concerned before giving the applicant an opportunity, upon entry into the national phase, to furnish the priority document within a time limit which is reasonable under the circumstances.

<u>Priority date</u>	<u>Priority application No.</u>	<u>Country or regional Office or PCT receiving Office</u>	<u>Date of receipt of priority document</u>
29 Janu 1999 (29.01.99)	11/21077	JP	03 Marc 2000 (03.03.00)

The International Bureau of WIPO 34, chemin des Colombettes 1211 Geneva 20, Switzerland Facsimile No. (41-22) 740.14.35	Authorized officer Juan Cruz Telephone No. (41-22) 338.83.38
--	--



PCT COOPERATION TREATY

From the INTERNATIONAL BUREAU

PCT

NOTICE INFORMING THE APPLICANT OF THE
COMMUNICATION OF THE INTERNATIONAL
APPLICATION TO THE DESIGNATED OFFICES

(PCT Rule 47.1(c), first sentence)

To:

HIROTA, Masanori
Akasaka Building No. 11
Room 502
8-11, Akasaka 2-chome
Minato-ku, Tokyo 107-0052
JAPONDate of mailing (day/month/year)
03 August 2000 (03.08.00)Applicant's or agent's file reference
A021-04PCT

IMPORTANT NOTICE

International application No.
PCT/JP00/00148International filing date (day/month/year)
14 January 2000 (14.01.00)Priority date (day/month/year)
29 January 1999 (29.01.99)

Applicant

JAPAN SCIENCE AND TECHNOLOGY CORPORATION et al

1. Notice is hereby given that the International Bureau has communicated, as provided in Article 20, the international application to the following designated Offices on the date indicated above as the date of mailing of this Notice:

US

In accordance with Rule 47.1(c), third sentence, those Offices will accept the present Notice as conclusive evidence that the communication of the international application has duly taken place on the date of mailing indicated above and no copy of the international application is required to be furnished by the applicant to the designated Office(s).

2. The following designated Offices have waived the requirement for such a communication at this time:

EP, RU, ZA

The communication will be made to those Offices only upon their request. Furthermore, those Offices do not require the applicant to furnish a copy of the international application (Rule 49.1(a-bis)).

3. Enclosed with this Notice is a copy of the international application as published by the International Bureau on 03 August 2000 (03.08.00) under No. WO 00/44881

REMINDER REGARDING CHAPTER II (Article 31(2)(a) and Rule 54.2)

If the applicant wishes to postpone entry into the national phase until 30 months (or later in some Offices) from the priority date, a demand for international preliminary examination must be filed with the competent International Preliminary Examining Authority before the expiration of 19 months from the priority date.

It is the applicant's sole responsibility to monitor the 19-month time limit.

Note that only an applicant who is a national or resident of a PCT Contracting State which is bound by Chapter II has the right to file a demand for international preliminary examination.

REMINDER REGARDING ENTRY INTO THE NATIONAL PHASE (Article 22 or 39(1))

If the applicant wishes to proceed with the international application in the national phase, he must, within 20 months or 30 months, or later in some Offices, perform the acts referred to therein before each designated or elected Office.

For further important information on the time limits and acts to be performed for entering the national phase, see the Annex to Form PCT/IB/301 (Notification of Receipt of Record Copy) and Volume II of the PCT Applicant's Guide.

The International Bureau of WIPO
34, chemin des Colombettes
1211 Geneva 20, Switzerland

Authorized officer

J. Zahra

Facsimile No. (41-22) 740.14.35

Telephone No. (41-22) 338.83.38



PCT

From the INTERNATIONAL BUREAU

NOTIFICATION OF ELECTION

(PCT Rule 61.2)

To:

Assistant Commissioner for Patents
United States Patent and Trademark
Office
Box PCT
Washington, D.C.20231
ETATS-UNIS D'AMERIQUE

in its capacity as elected Office

Date of mailing:

03 August 2000 (03.08.00)

International application No.:

PCT/JP00/00148

Applicant's or agent's file reference:

A021-04PCT

International filing date:

14 January 2000 (14.01.00)

Priority date:

29 January 1999 (29.01.99)

Applicant:

ASASHIMA, Makoto et al

1. The designated Office is hereby notified of its election made:



in the demand filed with the International preliminary Examining Authority on:

27 June 2000 (27.06.00)



in a notice effecting later election filed with the International Bureau on:

2. The election ☒ was

was not

made before the expiration of 19 months from the priority date or, where Rule 32 applies, within the time limit under Rule 32.2(b).

The International Bureau of WIPO
34, chemin des Colombettes
1211 Geneva 20, Switzerland

Facsimile No.: (41-22) 740.14.35

Authorized officer:

J. Zahra

Telephone No.: (41-22) 338.83.38



P C T

E P

国際調査報告

(法8条、法施行規則第40、41条)
[PCT18条、PCT規則43、44]

出願人又は代理人 の書類記号 A021-04PCT	今後の手続きについては、国際調査報告の送付通知様式(PCT/ISA/220) 及び下記5を参照すること。	
国際出願番号 PCT/JPO0/00148	国際出願日 (日.月.年) 14.01.00	優先日 (日.月.年) 29.01.99
出願人(氏名又は名称) 科学技術振興事業団		

国際調査機関が作成したこの国際調査報告を法施行規則第41条(PCT18条)の規定に従い出願人に送付する。
この写しは国際事務局にも送付される。

この国際調査報告は、全部で 4 ページである。

☐ この調査報告に引用された先行技術文献の写しも添付されている。

1. 国際調査報告の基礎

a. 言語は、下記に示す場合を除くほか、この国際出願がされたものに基づき国際調査を行った。

☐ この国際調査機関に提出された国際出願の翻訳文に基づき国際調査を行った。

b. この国際出願は、ヌクレオチド又はアミノ酸配列を含んでおり、次の配列表に基づき国際調査を行った。

☐ この国際出願に含まれる書面による配列表

☐ この国際出願と共に提出されたフレキシブルディスクによる配列表

☐ 出願後に、この国際調査機関に提出された書面による配列表

☐ 出願後に、この国際調査機関に提出されたフレキシブルディスクによる配列表

☐ 出願後に提出した書面による配列表が出願時における国際出願の開示の範囲を超える事項を含まない旨の陳述書の提出があった。

☐ 書面による配列表に記載した配列とフレキシブルディスクによる配列表に記載した配列が同一である旨の陳述書の提出があった。

2. ☐ 請求の範囲の一部の調査ができない(第I欄参照)。

3. ☐ 発明の単一性が欠如している(第II欄参照)。

4. 発明の名称は

☒ 出願人が提出したものを承認する。

☐ 次に示すように国際調査機関が作成した。

5. 要約は

☒ 出願人が提出したものを承認する。

☐ 第III欄に示されているように、法施行規則第47条(PCT規則38.2(b))の規定により国際調査機関が作成した。出願人は、この国際調査報告の発送の日から1カ月以内にこの国際調査機関に意見を提出することができる。

6. 要約書とともに公表される図は、

第 1 図とする。☒ 出願人が示したとおりである。

☐ なし

☐ 出願人は図を示さなかった。

☐ 本図は発明の特徴を一層よく表している。



第Ⅰ欄 請求の範囲の一部の調査ができないときの意見 (第1ページの2の続き)

法第8条第3項 (PCT 17条(2)(a)) の規定により、この国際調査報告は次の理由により請求の範囲の一部について作成しなかった。

1. ☐ 請求の範囲 _____ は、この国際調査機関が調査をすることを要しない対象に係るものである。つまり、
2. ☐ 請求の範囲 _____ は、有意義な国際調査をすることができる程度まで所定の要件を満たしていない国際出願の部分に係るものである。つまり、
3. ☐ 請求の範囲 _____ は、従属請求の範囲であってPCT規則6.4(a)の第2文及び第3文の規定に従って記載されていない。

第Ⅱ欄 発明の単一性が欠如しているときの意見 (第1ページの3の続き)

次に述べるようにこの国際出願に二以上の発明があるところの国際調査機関は認めた。

1. ☐ 出願人が必要な追加調査手数料をすべて期間内に納付したので、この国際調査報告は、すべての調査可能な請求の範囲について作成した。
2. ☐ 追加調査手数料を要求するまでもなく、すべての調査可能な請求の範囲について調査することができたので、追加調査手数料の納付を求めなかった。
3. ☐ 出願人が必要な追加調査手数料を一部のみしか期間内に納付しなかったので、この国際調査報告は、手数料の納付のあった次の請求の範囲のみについて作成した。
4. ☐ 出願人が必要な追加調査手数料を期間内に納付しなかったので、この国際調査報告は、請求の範囲の最初に記載されている発明に係る次の請求の範囲について作成した。

追加調査手数料の異議の申立てに関する注意

- ☒ 追加調査手数料の納付と共に出願人から異議申立てがあった。
☐ 追加調査手数料の納付と共に出願人から異議申立てがなかった。



A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))

Int.Cl¹ C 1 2 N 5 / 0 6

B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))

Int.Cl¹ C 1 2 N 5 / 0 6

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)

J I C S T ファイル (J O I S), M E D L I N E (S T N)

C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
P X	盛屋 直美 他, “両生類の初期胚を用いた試験管内での人工臓器の形成と移植”, BIO INDUSTRY (1999), Vol.16, No.6, p.12-19	1-17
P X	Chan T C et al., “A model system for organ engineering transplantation of in vitro induced embryonic kidney”, MEDLINE Acc.No.1999288549 & BATURWISSENSCHAFTIN (1999 May), Vol.86, No.5, p.224-227	1-17
X	香月 武人 他, “ハイブリッド型人工臓器へのアプローチ - 分化機能を有する膵β細胞ならびに肝細胞株の樹立-”, 病態生理 (1990), Vol.9, No.11, p.925-927	12

☒ C欄の続きにも文献が列挙されている。☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。

* 引用文献のカテゴリー

「A」 特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの

「E」 国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの

「L」 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)

「O」 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献

「P」 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献

「T」 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの

「X」 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの

「Y」 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの

「&」 同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

05.04.00

国際調査報告の発送日

18.04.00

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA/J P)

郵便番号 100-8915

東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官 (権限のある職員)

新見 浩一

4 N

9 1 6 2

電話番号 03-3581-1101 内線 3488



C (続き) . 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
X	JP, 3-147782, A (株式会社バイオマテリアル研究所) 24. 6月. 1991 (24. 06. 91) ファミリーなし	1 2
A	JP, 6-277050, A (鐘淵化学工業株式会社) 4. 10月. 1994 (04. 10. 94) ファミリーなし	1 - 1 7



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP00/00148

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
Int.Cl⁷ C12N 5/06

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)
Int.Cl⁷ C12N 5/06

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)
JICST (JOIS), MEDLINE (STN)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
PX	Naomi Moriya, et al., "Formation and Transplantation of Artificial Organ using the Early Embryo of Amphibia induced in Vitro" (in Japanese), BIO INDUSTRY (1999), Vol.16, No.6, p.12-19	1-17
PX	Chan T C et al., "A model system for organ engineering transplantation of in vitro induced embryonic kidney", MEDLINE Acc.No.1999288549 & BATURWISSENSCHAFTIN (1999 May), Vol.86, No.5, p.224-227	1-17
X	Taketo Kouzuki, et al., "Creating Pancreas Cells β and Hepatocytes having Specific Function; An Approach to Hybrid Type Artificial Organ" (in Japanese), Pathophysiology (Byotai Seiri) (1990), Vol.9, No.11, p.925-927	12
X	JP, 3-147782, A (Bio Material Kenkyusho K.K.), 24 June, 1991 (24.06.91) (Family: none)	12
A	JP, 6-277050, A (Kanegafuchi Chem. Ind. Co., Ltd.), 04 October, 1994 (04.10.94) (Family: none)	1-17

☐ Further documents are listed in the continuation of Box C.☐ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier document but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"I" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search
05 April, 2000 (05.04.00)Date of mailing of the international search report
18 April, 2000 (18.04.00)Name and mailing address of the ISA/
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT JP00/00148

Box I Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of Item 1 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☐ Claims Nos.:
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:

2. ☐ Claims Nos.:
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:

3. ☐ Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box II Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 2 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.
3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:

4. ☐ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

Remark on Protest



The additional search fees were accompanied by the applicant's protest.



No protest accompanied the payment of additional search fees.



A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl' C 12 N 5 / 06

B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl' C 12 N 5 / 06

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)

J I C S T ファイル (J O I S), M E D L I N E (S T N)

C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
P X	盛屋 直美 他, “両生類の初期胚を用いた試験管内での人工臓器の形成と移植”, BIO INDUSTRY (1999), Vol. 16, No. 6, p. 12-19	1-17
P X	Chan T C et al., “A model system for organ engineering transplantation of in vitro induced embryonic kidney”, MEDLINE Acc. No. 1999288549 & BATURWISSENSCHAFTIN (1999 May), Vol. 86, No. 5, p. 224-227	1-17
X	香月 武人 他, “ハイブリッド型人工臓器へのアプローチ—分化機能を有する膵β細胞ならびに肝細胞株の樹立—”, 病態生理 (1990), Vol. 9, No. 11, p. 925-927	12

☒ C欄の続きにも文献が列挙されている。☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。

* 引用文献のカテゴリー

「A」 特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの

「E」 国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの

「L」 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)

「O」 口頭による開示、使用、展示等に関する文献

「P」 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献

「T」 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの

「X」 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの

「Y」 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの

「&」 同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

05. 04. 00

国際調査報告の発送日

18.04.00

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA/JP)

郵便番号 100-8915

東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官 (権限のある職員)

新見 浩一

4 N

9 1 6 2

電話番号 03-3581-1101 内線 3488



C (続き) . 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
X	JP, 3-147782, A (株式会社バイオマテリアル研究所) 24. 6月. 1991 (24. 06. 91) ファミリーなし	1 2
A	JP, 6-277050, A (鐘淵化学工業株式会社) 4. 10月. 1994 (04. 10. 94) ファミリーなし	1 - 1 7



第Ⅰ欄 請求の範囲の一部の調査ができないときの意見（第1ページの2の続き）

法第8条第3項（PCT17条(2)(a)）の規定により、この国際調査報告は次の理由により請求の範囲の一部について作成しなかった。

1. ☐ 請求の範囲 _____ は、この国際調査機関が調査をすることを要しない対象に係るものである。
つまり、
2. ☐ 請求の範囲 _____ は、有意義な国際調査をすることができる程度まで所定の要件を満たしていない国際出願の部分に係るものである。つまり、
3. ☐ 請求の範囲 _____ は、従属請求の範囲であってPCT規則6.4(a)の第2文及び第3文の規定に従って記載されていない。

第Ⅱ欄 発明の単一性が欠如しているときの意見（第1ページの3の続き）

次に述べるようにこの国際出願に二以上の発明があるとこの国際調査機関は認めた。

1. ☐ 出願人が必要な追加調査手数料をすべて期間内に納付したので、この国際調査報告は、すべての調査可能な請求の範囲について作成した。
2. ☐ 追加調査手数料を要求するまでもなく、すべての調査可能な請求の範囲について調査することができたので、追加調査手数料の納付を求めなかった。
3. ☐ 出願人が必要な追加調査手数料を一部のみしか期間内に納付しなかったので、この国際調査報告は、手数料の納付のあった次の請求の範囲のみについて作成した。
4. ☐ 出願人が必要な追加調査手数料を期間内に納付しなかったので、この国際調査報告は、請求の範囲の最初に記載されている発明に係る次の請求の範囲について作成した。

追加調査手数料の異議の申立てに関する注意

- ☒ 追加調査手数料の納付と共に出願人から異議申立てがあった。
☐ 追加調査手数料の納付と共に出願人から異議申立てがなかった。



(書誌+要約+請求の範囲)

(19)【発行国】日本国特許庁(JP)
 (12)【公報種別】公開特許公報(A)
 (11)【公開番号】特開平6-277050
 (43)【公開日】平成6年(1994)10月4日
 (54)【発明の名称】動物細胞の固定化物および培養方法
 (51)【国際特許分類第5版】

C12N 5/06
 C12M 3/00 A

【FI】

C12N 5/00 E 8412-4B

【審査請求】未請求
 【請求項の数】2
 【出願形態】OL
 【全頁数】10
 (21)【出願番号】特願平5-68733
 (22)【出願日】平成5年(1993)3月26日
 (71)【出願人】
 【識別番号】000000941
 【氏名又は名称】鐘淵化学工業株式会社
 【住所又は居所】大阪府大阪市北区中之島3丁目2番4号
 (72)【発明者】
 【氏名】大島 宜雄
 【住所又は居所】茨城県つくば市小野川8-20
 (72)【発明者】
 【氏名】柳 健一
 【住所又は居所】茨城県つくば市東光台2丁目22-10
 (72)【発明者】
 【氏名】三好 浩稔
 【住所又は居所】兵庫県高砂市高砂町沖浜町2-63
 (72)【発明者】
 【氏名】山地 秀樹
 【住所又は居所】兵庫県神戸市垂水区塩谷町6-31-17
 (72)【発明者】
 【氏名】福田 秀樹
 【住所又は居所】兵庫県神戸市垂水区下畑町字唐ヶ谷1778-35
 (74)【代理人】
 【弁理士】
 【氏名又は名称】朝日奈 宗太(外1名)

(57)【要約】

【構成】微孔性の立体網状多孔質構造を有する担体に2種類以上の動物細胞を固定化してなる動物細胞固定化物、および動物細胞を培養するに際し、微孔性の立体網状多孔質構造を有する担体に2種類以上の動物細胞を固定化したのち、該動物細胞を該担体中にてそのまま生育せしめて培養することを特徴とする動物細胞の培養方法である。

【効果】本発明によれば、細胞を高密度状態のままで長期間安定に細胞の機能を維持することができる。したがって、細胞の機能を長期間安定に維持した状態で容易に細胞の高密度培養が達成できるので、有用生理活性物質の生産、ハイブリッド型人工臓器などに本発明を利用することができる。



【特許請求の範囲】

【請求項1】 微孔性の立体網状多孔質構造を有する担体に2種類以上の動物細胞を固定化してなる動物細胞固定化物。

【請求項2】 動物細胞を培養するに際し、微孔性の立体網状多孔質構造を有する担体に2種類以上の動物細胞を固定化したのち、該動物細胞を該担体中にてそのまま生育せしめて培養することを特徴とする動物細胞の培養方法。



詳細な説明

【発明の詳細な説明】

【0001】

【産業上の利用分野】本発明は、動物細胞の固定化物および培養方法に関する。さらに詳しくは、微孔性の立体網状多孔質構造を有する担体に2種類以上の動物細胞を固定化した動物細胞の固定化物、および該担体に2種類以上の動物細胞を固定化したのち、該動物細胞を該担体中にてそのまま生育せしめて培養する方法に関する。

【0002】

【従来の技術および発明が解決しようとする課題】ヒト、動物など多細胞系からなる生体内において、細胞は種々の生理活性物質を産生し、またこれを受け取ることにより個体としての恒常性を維持しているが、近年、このような生体内で細胞相互間に働く生理活性物質を取り出し再び生体内に戻すこと、すなわちこれらの生理活性物質を生体由来の医薬品として利用することの有用性が明らかにされてきた。従来このような生体由来の生理活性物質を取得するためには、とくにヒトのばあい、血液、尿などから抽出するなどの方法をとらざるをえず、これらの物質を大量に入手するには大きな制約があった。そこで、ヒトまたは動物の組織から遊離した正常細胞や遺伝子操作あるいは細胞融合操作を施したヒトまたは動物由来の各種の株細胞を大量に培養し、目的とする物質、たとえばインターフェロン、インターロイキン、各種の細胞増殖因子、ホルモン、血液凝固因子、モノクローナル抗体などを産生させることにより、これらの有用物質を大量に生産する方法が検討されている。すなわち、これらの生体由来の有用生理活性物質を効率よく生産するために、ヒトまたは動物の細胞を生体外の人工的な環境のもとで長期間その機能を安定に維持したままで高密度かつ大量に培養する技術を確立することが求められており、したがって、そのような技術の確立は産業上極めて意義深いものである。

【0003】また、ヒトまたは動物の組織から遊離した正常細胞の培養は、生きた細胞をそのまま利用するハイブリッド型人工臓器や皮膚移植のための細胞供給源として、また動物実験代替法としてもその応用が期待されている。たとえば、劇症肝炎を始めとする肝不全の治療のために人工的に肝機能を代行するための肝機能補助装置、すなわち人工肝臓においては、肝臓の機能があまりにも複雑で現在なお解明されていない部分も多いため人工的な手段のみで完全に代行することは現状では不可能であり、生体由来の肝素材、なかでも遊離肝細胞を利用するハイブリッド型のものの開発、実用化が期待されている。このような装置内においては、生体を維持するに十分な機能を確保するために、また装置工学的な観点から考えても、細胞を高密度かつ大量に培養できなければならないとともに、細胞が生体内において発現していた機能を保持したままで遊離した細胞を長時間安定に培養する必要がある。

【0004】動物細胞（以下、細胞という）は、血液系の細胞を除いて一般に、その生育に細胞が接着するための器壁を必要とするばあいが多く、従来より医学・生物学の研究の目的では、ガラスやプラスチックからなるペトリディッシュやフラスコの内部で単層培養が行われてきた。しかし、これらの培養においては、培養液中の細胞の密度は低くまた大量の細胞を培養するためには広大な表面積が必要であることから、前記のような目的で使用するに堪えないものであった。このため、細胞の高密度、大量培養を行なうためには、単位容積あたりの培養表面積（培養表面積／容積）を上げることが不可欠な課題となる。また、細胞は生体外ではその増殖力が小さい、あるいは遊離肝細胞のようにほとんど増殖しないものもあるため、このような細胞を培養する際には、あらかじめ培養器内で高密度にしかもできるだけ均一に植え付け、細胞を生育させる必要がある。

【0005】単位容積あたりの培養表面積を上げるために、表面に肝細胞を付着させた単層培養シートを多数積層する人工肝臓装置が開発されている（たとえば、特開昭64-17653号公報参照）。しかしこれらの装置では、装置を無菌的に組立てるのが困難であり、必要な細胞数を確保するのに多数のシートを準備しなければならず、また細胞が実際に使用できる状態になるまでに長時間を要するため、実用的ではない。

【0006】微小なビーズ、いわゆるマイクロキャリアの外表面に細胞を付着させ培養を行なう方法（たとえば、特開昭59-67965号公報参照）や中空繊維の外表面上に細胞を付着させ生育させるホローファイバー培養法（たとえばシー エフ ダブリュウルフ、アーティフィシャル オーガニズ(C.F.W.Wolf, Artificial Organs)、4巻、279 頁(1980)参照)も、単位容積あたりの培養表面積を上げるための培養法として検討されている。しかし、マイクロキャリアを用いて培養を行なうと、マイクロキャリア上の細胞は常に物理的外力にさらされるため、物理的外力に弱い細胞の生育は阻害され、またホローファイバー法でも、ファイバーを充填したモジュール内で溶存酸



素や栄養分の濃度分布に偏りが生じたりファイバーの目詰りが起こる点でまだまだ問題を残している。また、これらの基材への細胞の付着が不良であるばあいも多い。

【0007】また、細胞をアルギン酸カルシウムなどの多糖類のゲルに包括固定化し培養する方法も報告されているが(たとえば、特開昭60-18179号公報および特開昭60-224627号公報参照)、これらの方法は(1)固定化担体が培地中のある種の成分に対して不安定である、(2)固定化担体の物理的強度が弱く、長期的な培養が困難である、(3)固定化法が何段階にも及ぶという点で複雑である、(4)固定化の際に一部の細胞の死滅が避けられない、などの問題を有しており不都合であった。

【0008】一方、細胞が本来生体内において発現していた機能を長期間維持しながら培養を行なう目的で、2種類以上の細胞を混合して培養する試みが検討されている(たとえば、エスシマオカ、エクスペリメンタルセルリサーチ(S.Shimaoka, Exp.Cell Res.), 172巻、228頁(1987)参照)。しかし、これらの試みは細胞の特異機能の維持という点ではある程度効果を期待できるものの、ペトリディッシュなどの内部での培養にとどまっており、前記のように、細胞の高密度、大量培養を行なうには実用的な方法とは言えない。

【0009】そこで、前記の目的に応用可能な簡単な手段によるもので、細胞が長期にわたって安定にその機能を維持したまま高密度状態で生育できるような新たな培養法が望まれていた。

【0010】本発明者らは、かかる実情に鑑み、単位体積あたり広い表面積を確保できる微孔性の立体網状多孔質構造を有する担体を細胞の支持体として使用することに着目して鋭意研究を続けた結果、微孔性の立体網状多孔質構造を有する担体内で肝遊離細胞が良好に生育することを見出した(柳ら、人工臓器、19巻、840頁(1990)および柳ら、人工臓器、20巻、162頁(1991)参照)。さらに本発明者らは、微孔性の立体網状多孔質構造を有する担体を粒子状に細切したものおよびこれらの粒子状担体が少なくともその一部分において充填層を形成するような培養器を使用し、該培養器内において細胞を懸濁した培地を充填層に通液する方法により、特別な操作もしくは薬剤などの使用の必要もなく細胞は担体の細孔内に捕捉、固定化され、固定化された細胞は該充填層内に培養液を供給せしめることにより担体内に保持された状態で良好に生育し、かつ高い細胞密度がえられることを見出した(柳ら、人工臓器、21巻、1039頁(1992)参照)。しかし、細胞の機能を長期にわたって安定に維持するという課題に関してはこれらの方法をもってしても十分満足できる結果をえられず、さらに優れた培養方法の開発が望まれていた。

【0011】

【課題を解決するための手段】本発明は、微孔性の立体網状多孔質構造を有する担体に2種類以上の動物細胞を固定化した動物細胞の固定化物、および該担体に2種類以上の動物細胞を固定化したのち、該動物細胞を該担体中にてそのまま生育せしめて培養する方法に関する。

【0012】

【実施例】本発明者らは、前記目的を達成すべくさらに検討を重ねた結果、微孔性の立体網状多孔質構造を有する担体に、2種類以上の動物細胞を固定化したのち、該動物細胞を該担体中にてそのまま生育せしめて培養すると、該動物細胞は該担体内に保持された状態で良好に生育し、しかもある種の細胞においてはその機能が、ペトリディッシュなどの内部で同様に2種類以上の動物細胞を培養したばあいに比べても、長期間安定に維持されること、また、該担体を利用したばあいでも1種類の細胞のみを固定化したばあいに比べて、細胞の機能が長期間安定に維持されることを見出し、本発明を完成するに至った。

【0013】すなわち本発明は、細胞を固定化または培養するに際し、単位体積あたり広い表面積を確保できる微孔性の立体網状多孔質構造を有する担体を使用し、該担体に2種類以上の動物細胞を固定化したのち、該動物細胞を該担体中にてそのまま生育せしめて培養することを特徴とする動物細胞の固定化物および培養方法に関する。

【0014】つぎに本発明の固定化物および培養方法について説明する。

【0015】本発明の動物細胞の固定化物は、単位体積あたり広い表面積を確保できる微孔性の立体網状多孔質構造を有する担体に、2種類以上の動物細胞を捕捉し、保持または付着させたものをいう。

【0016】本発明において用いられる微孔性の立体網状多孔質構造を有する担体(以下、担体という)としては、単位体積あたりの表面積が広く、培養すべき細胞に対して毒性を示さず、該細胞が該担体中に保持されて外部に流出せず、培地の流入および流出がスムーズに行なわれ、かつ該担体内において細胞の付着、生育が容易であるものが望ましい。また前記担体は



水および培地中で変質せず、高圧蒸気滅菌に耐えうるような性質を有し、弱酸、アルカリおよび多くの有機溶媒に対して耐薬品性を示し、化学的に安定なものが好ましい。また細胞の大量培養を実現するためには担体を培養器内に大量に充填して使用するばあいがあるため、物理的強度が高く、比重は水よりわずかに高いものが好ましい。かかる担体を使用すると、高圧蒸気などにより担体の滅菌を培養器内などで容易に行なうことができ、また培養終了後担体を回収し加熱処理および弱酸、アルカリまたは溶剤処理することにより細胞を溶解し離脱させ、洗浄後担体を再使用することが可能となり好都合である。また、前記担体の有する立体網状多孔質構造とは、その担体を構成する物質が立体的にかつランダムな方向に網目状構造を形成した結果その担体内に複雑に入り組んだ細孔が生じたものであるが、この細孔は連続細孔、すなわちすべての細孔がつながって連続しており、その孔径が均一で、細孔の配列に方向性がなく、かつ空隙率が高いものがよい。さらに、前記担体の有する立体網状多孔質構造は、培養する細胞、担体を入れる培養器の形状、大きさによって用いる担体の細孔径も異なるが、細胞を固定化する際の効率、細胞の保持能、および担体内における細胞の生育状態から考慮して、平均孔径が約 $1 \sim 1000 \mu\text{m}$ 、好ましくは $5 \sim 600 \mu\text{m}$ の範囲内の孔径を有するものが望ましい。担体の孔径が約 $1 \mu\text{m}$ より小さいばあいは、細孔内に細胞が入り込むのが困難である。また、孔径が約 $1000 \mu\text{m}$ より大きいばあいは担体の比表面積が小さく、十分な細胞密度がえられない。細胞が浮遊性であるばあいには、孔径が約 $1000 \mu\text{m}$ より大きいと細胞は十分に細孔内に保持されない。

【0017】このような担体としては、たとえばろ過材などの用途として市販されている立体網状連続多孔質構造を有するポリビニルホルマール樹脂、高分子材料を発泡または多孔質化させたもの、ステンレススチール製の焼結金属担体、多孔性のガラスやセラミックス、またはキトサン、セルロース、デキストランなど天然由来の高分子物質で多孔質構造を有するものなどがあげられる。高分子の発泡または多孔質材料としては、ポリエチレンまたはポリプロピレンなどのポリオレフィン系；ブタジエンまたはイソプレンなどのジエン系；ポリウレタン；ポリ塩化ビニル、アクリルアミド、ポリスチレンまたはポリビニルアルコールなどのビニル系重合体；ポリエーテル、ポリエステル、ポリカーボネートまたはナイロンなどの縮合体；シリコンおよびフッ素樹脂などの材料が適用できる。そのなかでも、細胞の保持能の大小や担体の物理化学的特性あるいはコスト面から考慮すると、ポリビニルホルマール樹脂のうちホルマール化度が $60 \sim 90\%$ のもので、平均孔径が約 $20 \sim 600 \mu\text{m}$ の範囲の孔径を有するものがとくに好都合である。また、前記担体を、細胞の付着を促進する物質、たとえばコラーゲン、ポリリジン、フィブロネクチン、ラミニン、ヒストン、ゼラチンなどの物質でコーティング、架橋などの処理をして使用したり、また担体表面の荷電状態などの表面特性を変化させて使用することも可能である。

【0018】前記担体の形状、大きさとしては、使用する培養器の形状、大きさに応じて種々のものを使用することができるが、たとえば平板状、円柱状、中空円柱状、球状、ブロック状であってもよい。担体が平板状であるばあい、培養器の内部に静置したり、培養器の壁上や培養器内部に適宜配置して使用できる。担体が円柱状であるばあい、管型の培養器やタンク型の培養器が使用できるし、担体が中空円柱状であるばあい、担体の中空部分に培養液を供給することにより、培養液を流入方向に分配し、培養液を半径方向に流して担体内の通過距離を短くする、いわゆるラジアルフロー形式の培養器も使用できる。また、担体が球状やブロック状であるばあい、おおむね球状のものであれば直径 $0.1 \sim 20\text{mm}$ 、ブロック状のものであれば一辺が $0.1 \sim 20\text{mm}$ の大きさのものを使用し、培養器としては攪拌槽型、流動層型、充填層型などの培養器が使用できる。球状やブロック状の担体を培養器内において少なくともその一部分において充填層を形成するようにして使用すると、(1)平板状あるいは円柱状の比較的大きな担体を使用するばあいに比べて、細胞の固定化の際、充填層内における細胞密度の分布の偏りを少なくできる、(2)担体の大きさに応じて充填層内の充填密度を変更でき、また培養液の偏流も少なくできるため、装置の設計や操作上都合がよい、(3)充填層内の圧力損失も小さくできるため、培養液を流入するに要する所要動力を少なくしうる、などの利点を有するためきわめて好都合である。

【0019】本発明において用いられる細胞としては、本発明の方法の培養条件下にて生育可能なものであればよく、ヒトまたは動物由来の肝細胞、臍ランゲルハンス島細胞、内皮細胞、クッパー(Kupffer)細胞、線維芽細胞、胆管上皮細胞、伊東細胞、腎臓細胞、神経細胞、下垂体細胞、甲状腺細胞、副甲状腺細胞、副腎皮質細胞などの動物遊離細胞、初代細胞があげられる。さらに、これらの細胞を株化したものや、遺伝子組換えや細胞融合などの操作により人為的に変性された細胞や、一般的な株細胞であってもよい。これらの細胞の中から、2種類以上



の細胞が用いられる。この際、2種類以上の細胞のなかで、その機能の発現を培養の目的としている細胞が占める割合は、おおむね5～95%、好ましくは10～90%の範囲が適当である。また、使用される細胞の組合わせは培養の目的によって適宜選択されるが、たとえばハイブリッド型人工肝臓として用いるばあいには、肝実質細胞に加えて、血管内皮細胞、クッパー細胞、線維芽細胞、胆管上皮細胞、伊東細胞などのうち1種類以上の細胞が組合わせて使用される。

【0020】細胞の担体への固定化は、まず該担体の細孔内に該細胞を入り込ませることによりなされる。担体内の細孔内に入り込んだ細胞は、担体内に保持され自然に固定化が行なわれる。この際、培養すべきすべての種類の細胞を担体の細孔内に入り込ませてこれらの細胞を一度に固定化してもよいし、何種類かずつに分けて固定化を順次行なってもよい。いずれにしても、最終的に少なくとも2種類以上の細胞が担体に固定化される。細胞を担体の細孔内に入り込ませる方法としては、細胞を培地などに懸濁した液を担体上に注ぎ込む方法、ろ過の要領で細胞を懸濁した液を担体に通す方法、乾燥状態にある親水性が高い担体に細胞懸濁液を含浸させる方法、細胞を担体の共存下に培養する方法などがあげられる。細胞懸濁液を担体に通すことにより固定化する方法では、たとえば、担体が少なくともその一部分において充填層を形成するような培養器内において細胞懸濁液を担体充填層にゆっくりと注入することにより、比較的高効率でしかも充填層内において保持細胞数のばらつきが少ない状態に固定化できる。また、細胞懸濁液を担体充填層内で循環しても効率的に細胞を固定化できる。親水性の高い担体を使用しているばあいには、乾燥状態にある担体に細胞懸濁液を加えることにより、担体の吸水力により細胞を細孔内に入り込ませることができる。細胞を担体の共存下で培養することにより細胞を固定化する方法としては、たとえば細胞を懸濁した培養液中に担体を入れて振盪培養する方法、培養器内で細胞を懸濁した培養液中に担体を入れて攪拌するあるいは流動させる方法、あるいは培養器内で担体を固定し、細胞を懸濁した培養液を攪拌するあるいは流動させる方法などがあげられる。いずれの方法によっても、細胞はほぼ均一に固定化される。このような担体の細孔内に細胞を入り込ませる操作により、細胞は担体内に保持され自然に固定化されるので、細胞を担体に固定化するのに特別な薬剤、操作はとくに必要としない。すなわち、前に述べたような担体の構造上の特性により、細胞は該担体の細孔に入り込みさえすれば細孔内に容易に捕捉されそのまま付着でき、また単位体積あたり広い表面積を有しているため、該担体中での高密度な細胞の固定化が容易に達成できる。また、細胞の固定化を培養器の内部で容易にかつ自然に行なうことができるので、固定化の操作は従来の方法と比べて非常に簡単に短時間でなうことができ、細胞を傷つけることもほとんどなく、かつ雑菌汚染の可能性も少なくなる。

【0021】本発明の動物細胞の培養方法は、前記の方法により担体に2種類以上の細胞を固定化したのち、該動物細胞を該担体中にてそのまま生育せしめて培養することよりなる。すなわち、前に述べたような固定化の操作により、担体の細孔内に高密度状態に捕捉された細胞は、通常の培養方法のもとで、該担体に保持されたまま生育できるため、細胞の高密度培養が実現可能となる。さらに、このような培養環境の下では、担体を使用せずに通常よく用いられるディッシュなどの内部で同様に2種類以上の動物細胞を培養したばあいに比べても、細胞が本来生体内において発現していたある機能が長時間安定に維持される。また、本発明の方法は前記のゲル包括法やホローファイバー法などの固定化法に比べて拡散抵抗が小さいため、固定化担体内における培養液中の栄養分や溶存酸素などあるいは血漿中の細胞が代謝すべき物質の物質移動速度が速いという利点ももっている。このため、担体中にて培養液から栄養分や酸素などの供給と細胞が産生する物質の排出、あるいは血漿中の有害物質の代謝が培養器内で容易にかつ効率的に行なわれ、結果的に細胞を大規模にかつ高密度状態で培養でき、また細胞の機能を長期間安定に維持することが可能となる。

【0022】本発明の方法において使用される培養液としては、通常、細胞の培養に使用されうる一般的な培地であればよく、血清を加えたものでもよいし、血清を用いない、いわゆる無血清培地でもよい。本発明の方法をハイブリッド型人工臓器に適用するばあいには、通常の培地のほかに、血液より分離した血漿や血液そのものも使用される。

【0023】かくして培養器内において細胞は担体中に保持されているので、培養器からの培養液または血漿などの分離除去をスムーズにかつ簡単に行なうことができる。したがって、培養器から細胞の生育を阻害する物質を含んだ古い培養液を抜き出し、また新しい培養液や酸素を培養器に供給することにより、効率的な培養が可能となる。培養器から古い培養液を抜き出し新しい培養液を供給する方法は、連続的に行なってもよいし、間欠的に行なってもよい。遊離



肝細胞を培養しハイブリッド型人工肝臓として使用するばあいには、有害物質を多く含んだ血漿などを担体に供給することにより、担体内の肝細胞によって有害物質を代謝させることが可能となる。担体に培養液あるいは血漿などを供給する方式はとくに限定されないが、担体が少なくともその一部分において充填層を形成するような培養器を用いるばあい、培養器内において通常は充填層に対して一定方向に培養液あるいは血漿などを流す方式が用いられる。もちろん、培養液を流す方向を適時切り換えてもよいし、またいわゆるラジアルフロー方式を採ってもよい。これらの形式は培養器の大きさや形式あるいは使用する細胞によって適宜決定される。

【0024】培養器への酸素供給手段としては、培養器へ酸素を含有するガスを直接吹き込んでよいし、培養器内で酸素を含有するガスを培養液の表面に吹き付けることで供給してもよいし、酸素を含有する流体から膜などを介して間接的に供給してもよいし、または酸素の溶解度が高い液状酸素キャリアーを利用してもよい。また培養器から抜き出した培養液に酸素を供給したのち再び培養器に送り返すことも可能である。このばあいには、培養器から抜き出した培養液から同時に目的有用物質を回収し、また生育阻害物質を除去したのちに培養器に送り返してもよい。培養器の大きさによっては、培養器を炭酸ガス培養器などの内部に入れそのまま培養することも可能である。

【0025】つぎに実施例にもとづいて本発明をさらに詳しく説明するが、本発明はもとよりこれらに限定されるものではない。

【0026】実施例1(1)細胞体重150～250 gのウイスター系ラットからコラゲナーゼ灌流法(ピーオーセグレン、メソツズセルバイオロジー(P.O. Seglen, Methods Cell Biol.), 13巻、29頁(1976)参照)により肝実質細胞および肝由来非実質細胞を分散させた。肝実質細胞および肝由来非実質細胞をともに含んだ細胞分散液を、洗浄後所定の濃度になるように培地に懸濁して、培養に使用した。なお、非実質細胞には、内皮細胞、クッパー細胞などが含まれていた。

【0027】(2)培地培養用純水1リットルにウィリアムスE培地(Williams' medium E)(フロウ・ラボラトリーズ製)を11g、炭酸水素ナトリウム2.2 gを溶解したものに、デキサメサゾン(dexamethasone)0.1 μ M、インスリン(insulin)0.1 μ M、アプロチニン(aprotinin)5,000KIU/l、ペニシリンG(penicillin G)20,000IU/l、ストレプトマイシン(streptomycin)20mg/l、アンフォテリシンB(amphotericin B)50 μ g/lを加えて基本培地とした。基本培地に牛胎児血清(ギブコ・オリエンタル製)を10%添加したもの(以下、血清添加培地という)を使用した。

【0028】(3)細胞の固定化微孔性の立体網状多孔質構造を有する担体として、ポリビニルホルマール樹脂シート(カネボウ化成(株)製、カネボウスポンジシート、品名ベルイーター、品番A-3410(平均孔径:250 μ m))を使用し、これを2×20×20mmの平板状に切断した。この担体をガラスシャーレに入れ、120℃、20分間高圧蒸気滅菌した。その後、35mmペトリディッシュ(ファルコン製、1008)1個あたり担体を1枚入れ、担体をコラーゲンコートするために、0.03%コラーゲンを含有する0.02N酢酸に一晚浸潤したのち、リン酸バッファー(以下、PBSと略す)および基本培地で洗浄した。

【0029】つぎに、えられた肝実質細胞および肝由来非実質細胞をともに含む(肝実質細胞が約80%)細胞分散液を、肝実質細胞基準で 2.5×10^6 cells/mlとなるように血清添加培地に懸濁したのち、担体上に細胞懸濁液1mlを注入することにより、細胞を播種し、固定化した。その後1.5 mlの血清添加培地を加え、培地総量を2.5 mlとした。

【0030】(4)培養前記の播種、固定化操作を行なったのち、炭酸ガス培養器内(37℃、95% Air、5%CO₂)で培養を行なった。培養開始後3時間目で培地の全量を新しい血清添加培地に交換し、2.5 mlの培地で培養を継続した。以後培地交換を毎日行ない、培地交換後の培地中のラットアルブミン濃度をサンドイッチELISA(Enzyme-linked immunosorbent assay)法にて測定することで、肝細胞の特異的機能であるアルブミン合成能を調べた。

【0031】培養実験の結果、えられたアルブミン合成能の経時変化を表1に示す。これより、培養開始後11時間目では約1.5 μ g/h/dishであったアルブミン合成能は培養期間を通して良好に維持され、ほぼ一定の合成能を示したことから、肝細胞は良好に培養されかつ細胞の機能が長期間十分に維持されていることがわかった。

【0032】

【表1】



表 1

培養時間 [h]	アルブミン合成能 [$\mu\text{g}/\text{h}/\text{dish}$]
11.2	1.570 \pm 0.263
32.4	1.226 \pm 0.331
58.9	1.243 \pm 0.477
84.1	1.468 \pm 0.496
106.7	1.479 \pm 0.646
131.2	1.380 \pm 0.534
153.8	1.401 \pm 0.545

Mean \pm S.D.

【0033】実施例2実施例1で使用した担体の代わりに、平均孔径の異なるポリビニルホルマール樹脂シート(カネボウ化成(株)製、カネボウスポンジシート、品名 ベルイーター、品番 A-3310(平均孔径:100 μm)、A-3420(平均孔径:350 μm))を用いた以外は、実施例1と全く同様に培養実験を行なった。

【0034】培養実験の結果、えられたアルブミン合成能の経時変化を表2に示すが、いずれの培養においても、実施例1の結果と同様にアルブミン合成能は良好に維持された。このとき、アルブミン合成能の維持に及ぼす担体の細孔径の影響は、この孔径範囲においては明確には見られなかった。

【0035】

【表2】

表 2

培養時間 [h]	担体孔径 100 μm	担体孔径 350 μm
	アルブミン合成能 [$\mu\text{g}/\text{h}/\text{dish}$]	アルブミン合成能 [$\mu\text{g}/\text{h}/\text{dish}$]
11.2	1.550 \pm 0.231	1.279 \pm 0.363
32.4	1.151 \pm 0.051	1.421 \pm 0.315
58.9	1.204 \pm 0.192	1.463 \pm 0.295
84.1	1.227 \pm 0.223	1.738 \pm 0.189
106.7	1.112 \pm 0.201	1.646 \pm 0.091
131.2	1.024 \pm 0.246	1.342 \pm 0.203
153.8	0.996 \pm 0.203	1.315 \pm 0.004

Mean \pm S.D.

【0036】実施例3担体として、コラーゲンコートせずに高圧蒸気滅菌後PBSおよび基本培地で洗浄した担体を用いた以外は実施例1と同様の培養実験を行なった。

【0037】培養実験の結果、えられたアルブミン合成能の経時変化を表3に示すが、培養開始後60時間目までは合成能は若干低下したがその後上昇し、培養終了時にも培養11時間目以上の活性を示した。

【0038】この結果から、担体にコラーゲンコートをしなくとも、コラーゲンコートをした担体と同等、あるいはそれ以上の肝細胞の活性が維持されることがわかった。したがって本方法により、細胞の固定化の際に特別な操作を行なわなくとも、良好に細胞を培養でき、かつ細胞の機能は十分に維持されることが示された。

【0039】

【表3】



表 3

培養時間 [h]	アルブミン合成能 [$\mu\text{g}/\text{h}/\text{dish}$]
11.2	1.236 \pm 0.160
32.4	0.938 \pm 0.095
58.9	0.884 \pm 0.022
84.1	1.310 \pm 0.187
106.7	1.580 \pm 0.022
131.2	1.432 \pm 0.082
153.8	1.620 \pm 0.055

Mean \pm S.D.

【0040】実施例4担体として、コラーゲンコートせずに高圧蒸気滅菌後PBSおよび基本培地で洗浄した担体を用いた以外は実施例2と同様の培養実験を行なった。

【0041】培養実験の結果、えられたアルブミン合成能の経時変化を表4に示すが、担体孔径の違いが活性の維持に及ぼす影響はほとんどみられず、実施例3の結果と同様に、培養開始後60時間目までは合成能は若干低下したがその後上昇する結果がえられた。したがって、担体にコラーゲンコートを行なわないばあいにも、担体孔径にかかわらず細胞の活性は良好に維持されており、本発明の有効性が示された。

【0042】

【表4】

表 4

培養時間 [h]	担体孔径 100 μm	担体孔径 350 μm
	アルブミン合成能 [$\mu\text{g}/\text{h}/\text{dish}$]	アルブミン合成能 [$\mu\text{g}/\text{h}/\text{dish}$]
11.2	1.231 \pm 0.162	1.151 \pm 0.082
32.4	0.963 \pm 0.210	0.983 \pm 0.122
58.9	0.875 \pm 0.122	1.043 \pm 0.070
84.1	1.267 \pm 0.120	1.301 \pm 0.228
106.7	1.587 \pm 0.202	1.423 \pm 0.139
131.2	1.807 \pm 0.084	1.319 \pm 0.126
153.8	1.718 \pm 0.193	1.389 \pm 0.144

Mean \pm S.D.

【0043】比較例1(1)細胞実施例1と同様の方法にて、肝実質細胞および肝由来非実質細胞をともに含んだ細胞分散液をえた。この分散液を50g \times 1min で遠心し、上清を除去することにより、肝実質細胞のみを含んだ懸濁液をえた。この肝実質細胞のみを含んだ懸濁液を、洗浄後所定の濃度になるように培地に懸濁して、培養に使用した。

【0044】(2)培地実施例1と同じ培地を用いた。

【0045】(3)細胞の播種35mmペトリディッシュ(ファルコン製、1008)をコラーゲンコートするために、0.03%コラーゲンを含有する0.02N酢酸に一晩浸潤したのち、PBSおよび基本培地で洗浄した。

【0046】つぎにえられた肝実質細胞を、 1.0×10^6 cells / mlとなるように血清添加培地に懸濁したのち、細胞懸濁液2mlをディッシュに注入することにより、細胞を播種した。

【0047】(4)培養培地量が2.0 mlである以外はすべて実施例1と同様に行なった。

【0048】培養実験の結果、えられたアルブミン合成能の経時変化を表5に示す。初期のアルブミン合成能は実施例1に比べて高い値を示し、培養開始後60時間目まではわずかに上昇した。しかしその後、肝細胞のアルブミン合成能は急激に低下していることがわかる。この結果から、肝細胞のみの培養においては、長期間の肝機能の維持が困難であることが明らかである。



【0049】

【表5】

表 5

培養時間 [h]	アルブミン合成能 [$\mu\text{g}/\text{h}/\text{dish}$]
12.9	3.425 ± 0.263
33.7	4.172 ± 0.265
57.9	4.016 ± 0.255
82.0	3.626 ± 0.437
106.0	2.432 ± 0.272
129.8	1.905 ± 0.171
153.7	1.594 ± 0.010
177.7	1.243 ± 0.011
201.3	1.084 ± 0.025
216.6	0.883 ± 0.068

Mean \pm S.D.

【0050】比較例2(1)細胞実施例1と同様の方法にて、肝実質細胞および肝由来非実質細胞をともに含んだ細胞分散液をえて、この分散液を培養に使用した。

【0051】(2)培地実施例1と同じ培地を用いた。

【0052】(3)細胞の播種比較例1と同様に35mmペトリディッシュ(ファルコン製、1008)をコラーゲンコートしたものと、コラーゲンコートしなかったペトリディッシュを使用した。

【0053】つぎに、えられた肝実質細胞および肝由来非実質細胞をともに含んだ細胞分散液を、肝実質細胞基準で 1.0×10^6 cells / mlとなるように血清添加培地に懸濁したのち、この細胞懸濁液2.5 mlをディッシュに注入することにより、細胞を播種した。

【0054】(4)培養実施例1と同様に行なった。

【0055】培養実験の結果、えられたアルブミン合成能の経時変化を表6に示すが、コラーゲンコートしたものでは、培養開始後60時間目までは合成能の一時的な上昇がみられたが、その後、肝細胞のアルブミン合成能は急激に低下していることがわかる。そして培養153時間後には、培養11時間後のレベルまで活性が低下した。またコラーゲンコートしなかったものでは、活性の上昇はほとんどみられず、徐々に低下していることがわかる。これらの結果から、ディッシュによる単層培養では、一時的な活性の上昇はみられるが、その後かなり低下するか、あるいは培養期間を通して徐々に低下しており、担体を使用したときのように長期間安定して活性を維持するような結果はえられなかった。

【0056】

【表6】

表 6

培養時間 [h]	コラーゲンコートあり	コラーゲンコートなし
	アルブミン合成能 [$\mu\text{g}/\text{h}/\text{dish}$]	アルブミン合成能 [$\mu\text{g}/\text{h}/\text{dish}$]
11.3	1.058 ± 0.046	0.686 ± 0.022
32.4	2.366 ± 0.117	0.715 ± 0.032
58.9	2.577 ± 0.173	0.591 ± 0.075
84.1	2.288 ± 0.033	0.550 ± 0.001
106.7	1.911 ± 0.003	0.534 ± 0.002
131.2	1.229 ± 0.075	0.455 ± 0.016
153.8	1.013 ± 0.142	0.461 ± 0.043

Mean \pm S.D.



【0057】比較例3(1)細胞比較例1と同様の方法にて、肝実質細胞のみを含んだ細胞懸濁液をえて、これを培養に使用した。

【0058】(2)培地実施例1と同様の培地を用いた。

【0059】(3)細胞の固定化担体として、コラーゲンコートせずに高圧蒸気滅菌後PBSおよび基本培地で洗浄した担体を用いた以外は実施例1と同様の操作を行なった。すなわち、肝実質細胞を 2.5×10^6 cells / mlとなるように血清添加培地に懸濁したのち、担体上に細胞懸濁液1 mlを注入することにより、細胞を播種し、固定化した。その後1.5 mlの血清添加培地を加え、培地総量を2.5 mlとした。

【0060】(4)培養実施例1と同様に行なった。

【0061】培養実験の結果、えられたアルブミン合成能の経時変化を表7に示すが、培養開始後80時間目までは合成能はほぼ維持されたが、その後、肝細胞のアルブミン合成能は大幅に低下していることがわかる。この結果から、肝実質細胞のみの培養においては、担体を用いたばあいでも長期間の肝機能の維持が困難であることがわかる。

【0062】

【表7】

表 7

培養時間 [h]	アルブミン合成能 [μ g/h/dish]
12.8	1.832 \pm 0.195
33.7	1.745 \pm 0.233
57.8	1.911 \pm 0.300
82.0	1.658 \pm 0.232
105.9	1.265 \pm 0.158
129.8	1.087 \pm 0.052
153.7	0.694 \pm 0.015
177.6	0.427 \pm 0.021
201.2	0.415 \pm 0.015
216.6	0.354 \pm 0.031

Mean \pm S.D.

【0063】

【発明の効果】本発明によれば、細胞を高密度状態のままで長期間安定に細胞の機能を維持することができる。したがって、細胞の機能を長期間安定に維持した状態で容易に細胞の高密度培養が達成できるので、有用生理活性物質の生産、ハイブリッド型人工臓器などに本発明を利用することができる。

